CARDIALE GLYCOGENPHOSPHORYLASE-ISOENZYME AUS HERZEN GESUNDER UND DIABETISCHER RATTEN: ISOLIERUNG, CHARAKTERISIERUNG UND REGULATION

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Norbert Berndt

aus Düsseldorf

Düsseldorf 1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543909_0084

CARDIALE GLYCOGENPHOSPHORYLASE-ISOENZYME AUS HERZEN GESUNDER UND DIABETISCHER RATTEN: ISOLIERUNG, CHARAKTERISIERUNG UND REGULATION

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

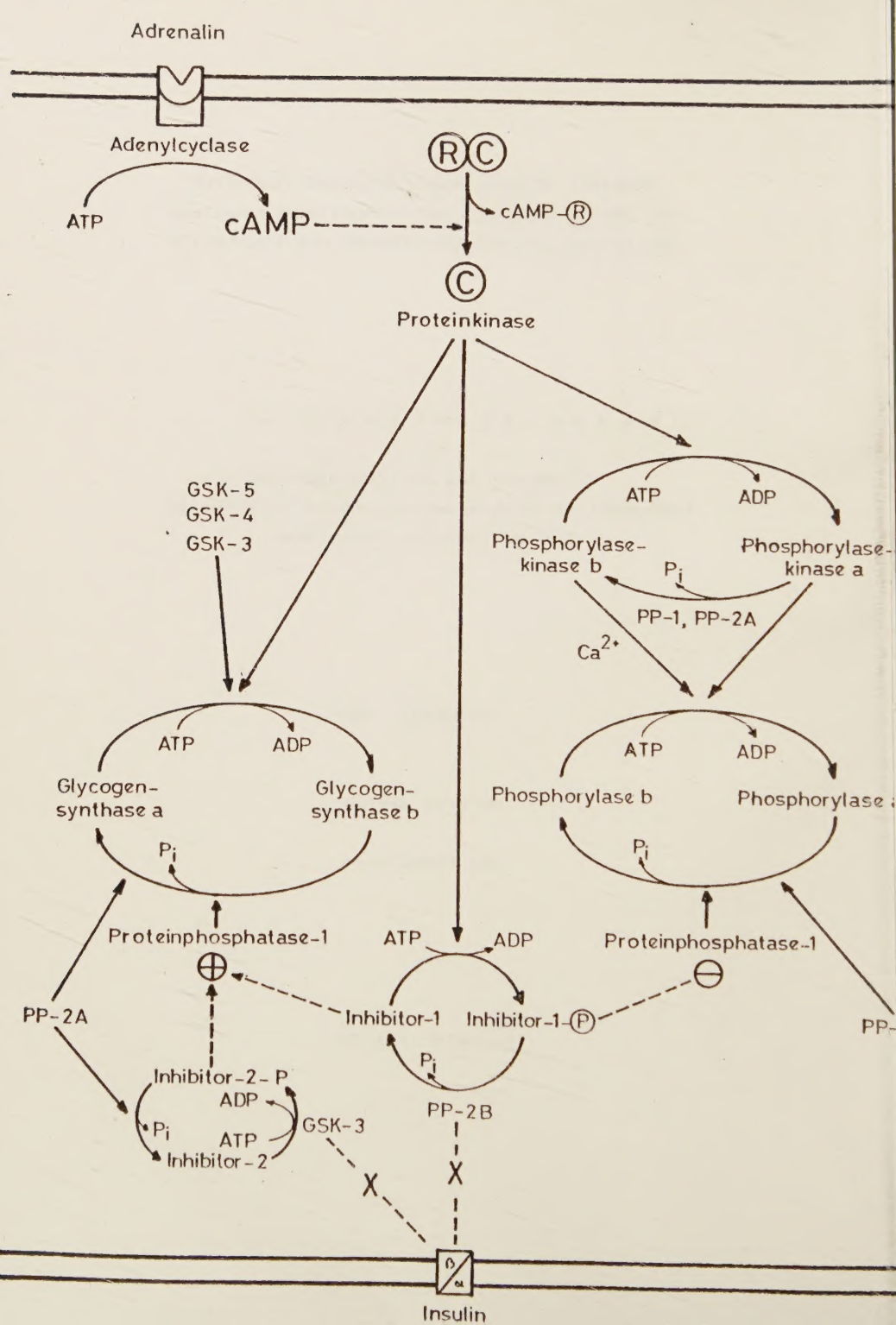
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Norbert Berndt

aus Düsseldorf

Düsseldorf 1986


Adrenalin
Adenylcyclase
ATP
cAMP
R C
cAMP-R
C
Proteinkinase
GSK-5
GSK-4
GSK-3
ATP
ADP
Phosphorylase-kinase b
Phosphorylase-kinase a
Pi
PP-1, PP-2A
Ca2+
ATP
ADP
Glycogen-synthase a
Glycogen-synthase b
Pi
ATP
ADP
Phosphorylase b
Phosphorylase
Pi
Proteinphosphatase-1
ATP
ADP
Proteinphosphatase-1
PP-2A
Inhibitor-1
Inhibitor-1-P
Pi
PP-2B
Inhibitor-2-P
ADP
Pi
ATP
Inhibitor-2
GSK-3
X
X
Insulin

Regulation des Glycogenstoffwechsels in der Muskelzelle

1. Anregung der Glycogenmobilisation durch Adrenalin: Bindung des Adrenalin an einen ß-adrenergen Rezeptor hat Stimulation der zellmembrangebundenen Adenylcyclase zur Folge, die aus ATP die Bildung von cAMP, dem zweiten Boten des Adrenalins, katalysiert.
cAMP aktiviert eine cytosolische Proteinkinase. Dieses Enzym phosphoryliert/aktiviert die Phosphorylasekinase, die ihrerseits die Phosphorylase, das Schlüsselenzym der Glycogenolyse, phosphoryliert/aktiviert.
Die Proteinkinase phosphoryliert/inaktiviert gleichzeitig die Glycogensynthase, die zudem Substrat von mindestens vier anderen Kinasen ist. Durch die Phosphorylierung des Inhibitor-1 wird dieser aktiv und hemmt die Proteinphosphatase-1, also eins jener Enzyme, die die Phosphorylase inaktivieren und die Synthase aktivieren. Die Schlüsselenzyme des Glycogenmetabolismus sind somit infolge einer konzertierten Aktion mehrerer Proteine auf Glycogenabbau "eingestellt".
2. Anregung der Glycogenmobilisation durch Ca^{2+}: Das bei Kontraktion der Muskelzelle vermehrt sezernierte freie Ca^{2+} stimuliert direkt die Phosphorylasekinase (eine ihrer Untereinheiten ist Calmodulin), die daraufhin die Phosphorylase aktiviert und die Glycogensynthase inaktiviert. Damit steht dem Muskel bei erhöhtem Energiebedarf ein cAMP-unabhängiger Weg der Glycogenmobilisation zur Verfügung.
2. Anregung der Glycogensynthese durch Insulin: Folgende Mechanismen werden diskutiert:
Insulin stimuliert die Dephosphorylierung/Inaktivierung des Inhibitor-1, wodurch die Proteinphosphatase-1 aktiviert wird.
Insulin stimuliert die Glycogensynthasekinase-3, die den Inhibitor-2 phosphoryliert und damit wiederum die Proteinphosphatase-1 aktiviert.
Daneben werden auch Mechanismen in Betracht gezogen, die direkt die Proteinphosphatasen-1 oder -2A stimulieren. Zweite intracelluläre Boten des Insulins sind zwar vielfach postuliert, jedoch bisher noch nicht identifiziert worden.

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. P. Rösen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. K.-D. Spindler

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Februar 1986

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Abkürzungen..... 1

1. Einleitung..... 3

2. Material und Methoden..... 7
2.1. Chemikalien..... 7
2.2. Geräte und Maschinen..... 8
2.3. Versuchstiere..... 9
2.4. Säulenchromatographie..... 9
2.4.1. Ionenaustauschchromatographie..... 9
2.4.2. Gelfiltration.....10
2.4.3. Affinitätschromatographie.....10
2.5. Proteinpräparationen.....11
2.5.1. Glycogenphosphorylase b aus Kaninchenskelettmuskel.....11
2.5.2. Glycogenphosphorylase b aus Rattenherz und -muskel.....12
2.5.3. Proteinphosphatase-1 aus Kaninchenskelettmuskel.....13
2.6. Präparation ^{32}P-markierter Phosphorylase a.....14
2.7. Proteinbestimmung.....15
2.8. Enzymassays.....15
2.8.1. Glycogenphosphorylase.....15
2.8.2. Glycogensynthase.....17
2.8.3. cAMP-abhängige Proteinkinase.....17
2.8.4. Phosphorylasekinase.....18
2.8.5. Proteinphosphatase.....18
2.9. Elektrophoretische Methoden.....19
2.9.1. SDS-Polyacrylamid-Gradientengel-Elektrophorese.....19
2.9.2. Native Polyacrylamid-Gradientengel-Elektrophorese.....21
2.9.3. Isoelektrische Fokussierung.....22
2.9.4. Phosphorylase-Aktivität in Polyacrylamidgelen.....22
2.10. Immunologische Analysen.....23
2.11. Autoradiographie.....24
2.12. Interkonversionsreaktionen der Phosphorylase.....24
2.12.1. Phosphorylierung der Phosphorylase b.....24
2.12.2. Dephosphorylierung der ^{32}P-Phosphorylase a.....26

2.13. Peptide Mapping.....26
2.14. Berechnungen und Statistik.....

3. Ergebnisse.....28
3.1. Präparation der Phosphorylase b aus Kaninchenskelettmuskel.28
3.2. Proteinphosphatase-1 aus Kaninchenskelettmuskel.....28
3.2.1. Enzympräparation.....30
3.2.2. Enzymeigenschaften.....35
3.3. Präparation der Phosphorylasen Ib und IIb aus Rattenherz...40
3.3.1. Normaltiere.....40
3.3.2. Akut diabetische Tiere.....45
3.4. Identifikation der cardialen Phosphorylase-Aktivitäten.....45
3.4.1. Präparation der Phosphorylase b aus Rattenskelettmuskel..46
3.4.2. Immunologische Eigenschaften der Phosphorylasen I und II.46
3.4.3. Phosphorylase-Isoenzyme im Herzmuskelextrakt.....50
3.5. Physikochemische Eigenschaften der Phosphorylase-Isoenzyme.51
3.5.1. Effekt des pH-Wertes auf die Phosphorylase-Aktivität.....51
3.5.2. Effekt der Temperatur auf die Phosphorylase-Aktivität....53
3.5.3. Molekulargewichte der Untereinheiten.....57
3.5.4. Quartärstruktur der nativen Isoenzyme.....58
3.6. Interkonversionsreaktionen der Phosphorylase-Isoenzyme.....61
3.6.1. Phosphorylierung und Aktivierung.....64
3.6.2. Isoelektrische Punkte der Phosphorylase-Isoenzyme.....68
3.6.3. Molekulargewichte der phosphorylierten Phosphorylasen....70
3.6.4. Dephosphorylierung und Inaktivierung.....72
3.6.5. Proteinphosphatasen im diabetischen Rattenherzen.....77
3.7. Peptide Mapping.....79
3.7.1. Kaninchenskelettmuskel-Phosphorylase.....80
3.7.2. Rattenherz-Phosphorylasen.....81
3.8. Kinetische Eigenschaften.....87

4. Diskussion.....90

5. Zusammenfassung.....104

6. Literaturverzeichnis.....107

A b k ü r z u n g e n

AC	Affinitätschromatographie
ACES	N-(2-Acetamid)-2-aminoethansulfonsäure
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
D	Diabetes, diabetisch
DEAE-	Diethylaminoethan-
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GF	Gelfiltration
G1P	Glucose-1-phosphat
G6P	Glucose-6-phosphat
G6P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GP	Glycogenphosphorylase
GPK	Phosphorylasekinase
GPP	Phosphorylase-Phosphatase
GS	Glycogensynthase
GSK	Glycogensynthasekinase
IEC	Ionenaustauschchromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
i.p.	intraperitoneal
I.P.	Isoelektrischer Punkt
K_{av}	Verteilungskoeffizient bei der GF: $(v_e - v_0)/(v_t - v_0)$
kD, K	Kilo-Dalton
KSM	Kaninchenskelettmuskel
MES	2(N-Morpholin)ethansulfonsäure
M_r	Relative molare Masse, Molekulargewicht
N	Normal
NADP	Nicotinadenindinucleotid-phosphat (oxidiert)

N-PAGE	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese
P_i	Anorganisches Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelèktrophorese
PK	Proteinkinase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PP	Proteinphosphatase
RSM	Rattenskelettmuskel
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLCK	Tosyllysylchloromethylketon
TPCK	Tosylphenylchloromethylketon
Tris	Tris(-hydroxymethyl)aminomethan
u	mikro-
UDP	Uridin-5'-diphosphat
v_0	Ausschlußvolumen
v_e	Elutionsvolumen
v_t	Säulentotalvolumen
Vol.	Volumen
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

Hier nicht aufgeführte Abkürzungen und Symbole werden im Text erläutert.

1. E i n l e i t u n g

Glycogenphosphorylase (GP) katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des intracellulären Glycogenabbaus. 1943 entdeckten Cori und Green, daß dieses Enzym in zwei interkonvertierbaren Formen vorkommt, die sie als Phosphorylase a und b bezeichneten (1,2). Während die a-Form spontan aktiv ist, benötigt die b-Form die Gegenwart des allosterischen Effektors AMP, um Aktivität zu zeigen. Erst ein gutes Jahrzehnt später wurde von Sutherland & Wosilait sowie Fischer & Krebs der Mechanismus der Interkonversion zwischen beiden Enzymformen aufgeklärt. Durch Untersuchungen an Leber- (3) und Muskelextrakten (4) wurde gezeigt, daß während der Umwandlung der b- in die a-Form die terminale Phosphatgruppe des ATP auf einen Serinrest des Enzyms übertragen wird und daß die Rückreaktion eine hydrolytische Abspaltung des kovalent gebundenen P_i beinhaltet. Die Phosphorylierung wird von Phosphorylasekinase (GPK), die Dephosphorylierung von Phosphorylase-Phosphatase (GPP) katalysiert.

Seither ist die GP eines der bestcharakterisierten Enzyme und gilt als Prototyp der kovalenten Modifikation durch Phosphorylierung. Unsere gegenwärtigen Kenntnisse der physikochemischen und physiologischen Eigenschaften der GP stammen vorwiegend aus dem Studium des Kaninchenmuskelenzyms. Cardiale Phosphorylasen in gereinigter Form sind bisher nur aus Kaninchen- (5) und Schweineherz (6) gewonnen worden.

Da der cardiale Glycogenstoffwechsel meist am perfundierten Rattenherzen untersucht wird, andererseits die GP aus diesem Organ noch nicht beschrieben ist, war ein erstes Anliegen dieser Arbeit, ein zuverlässiges Reinigungsverfahren für Rattenherz-GP mit hoher Ausbeute zu entwickeln und das Enzym anschließend zu charakterisieren.

Früher wurde gezeigt, daß die cardiale GP-Aktivität von einem Ionenaustauschgel in zwei Peaks eluiert wird (7). Ein Präparationsartefakt konnte, obwohl sich die beiden isolierten GP-Formen kinetisch voneinander unterschieden, allerdings nicht sicher ausgeschlossen werden. Das zweite Ziel dieser Arbeit bestand darin zu prüfen, ob beide Formen im Rattenherzen vorkommen bzw. ob das Auftreten zweier

Enzymformen präparationsbedingt ist und somit möglicherweise einen Artefakt darstellt. Falls dies ausgeschlossen werden kann, sollten funktionelle und strukturelle Unterschiede im Hinblick auf die Regulation des Glycogenstoffwechsels untersucht werden.

Die Regulation des Glycogenstoffwechsels unterliegt der Kontrolle mehrerer Hormone. Aufgrund der Arbeiten von Sutherland sowie Krebs in den fünfziger und sechziger Jahren verstehen wir heute die Adrenalinwirkung recht gut auf molekularer Ebene. Adrenalin stimuliert über einen ß-adrenergen Rezeptor die zellmembrangebundene Adenylcyclase, die die Bildung von cAMP aus ATP katalysiert (8). Dieser intracelluläre second messenger aktiviert eine cAMP-abhängige Proteinkinase, die die GPK aktiviert, welche dann im letzten Schritt GPb in GP a überführt (9-11). Mit Ausnahme der Adenylcyclase werden alle an dieser Kaskade beteiligten Enzyme durch Phosphorylierung aktiviert. Obwohl Insulin einen Einfluß auf den Glycogenstoffwechsel hat, ist dessen Wirkungsmechanismus nach wie vor unklar (s.u.). Entsprechend der Vorstellung, daß Enzymphosphorylierung katabole, Dephosphorylierung hingegen anabole Prozesse begünstigt, lag es nahe zu vermuten, daß die Proteinkinasen, Proteinphosphatasen oder deren Substrate (s. u.) Zielenzyme des Insulins sind (12,13), dessen vielfältige anabole Wirkungen seit langem bekannt sind (14).
Ein in diesem Zusammenhang wichtiger Befund war, daß Insulin die Glycogensynthase (GS) aktiviert. Das Enzym wird durch Dephosphorylierung aktiviert, durch Phosphorylierung inaktiviert und somit abhängig von seinem allosterischen Aktivator Glucose-6-phosphat (15). Die Dephosphorylierung der GS wird in vivo in der Leber (16,17), im Skelettmuskel (18) und im Herzen (19,20) durch Insulin stimuliert. Gleichzeitig wird in der Leber die Dephosphorylierung (=Inaktivierung) der GP bewirkt (17,21). Dieser Effekt wird durch die koordinierte Aktion der Proteinphosphatase-1 (PP-1) und -2A (PP-2A), die beide GP und GS dephosphorylieren, vermittelt (Review 22) (zur Klassifizierung der Proteinphosphatasen siehe Kap. 3.2.).
Übereinstimmend mit diesen Befunden sind im diabetischen Herzen die Aktivitäten der GSa (7,20) als auch der Glycogensynthasephosphatase (GSP) (20) vermindert. Außerdem ist die insulinabhängige Aktivierung

der GSP gestört (20). Dementsprechend würde man annehmen, daß im Insulinmangel das Herz wie die Leber (23) allmählich sein Glycogen verliert. Das diabetische Herz akkumuliert in vivo jedoch Glycogen (7,24,25), obwohl die basalen Aktivitäten der GP, ihrer Kontrollenzyme GPK und GPP (26) als auch die Adenylcyclase-Aktivität und cAMP-Spiegel unverändert gegenüber der Kontrolle (7) sind.

Prinzipiell könnte Insulin bzw. ein Insulinmangel auf drei Ebenen in die Regulation des Glycogenmetabolismus eingreifen: i) durch Hemmung der Proteinkinasen oder ii) durch Aktivierung der Proteinphosphatasen oder iii) durch Veränderungen der phosphorylierbaren/phosphorylierten Enzyme selbst, sodaß sie schlechtere Substrate der Kinasen oder bessere Substrate der Phosphatasen werden.

Ad i) Ein solcher Mechanismus wurde bisher noch nicht nachgewiesen.

Ad ii) Die für den Glycogenstoffwechsel besonders wichtige PP-1 wird durch den sog. Inhibitor-1 (27) reguliert; dieses Protein wird infolge eines Adrenalinreizes verstärkt cAMP-abhängig phosphoryliert und erst dadurch zum Inhibitor (28); Insulin bewirkt die Dephosphorylierung des Inhibitor-1 (29) durch PP-2B (30) und damit die Aktivierung der PP-1.

PP-1 wird durch ein weiteres Protein, Inhibitor-2 (27) gehemmt, mit dem es in vitro Komplexe und die sog. Mg-ATP-abhängige Proteinphosphatase bildet (31). Die Aktivierung der PP-1 erfordert die Phosphorylierung des Inhibitor-2 durch eine bestimmte Proteinkinase (Glycogensynthasekinase-3, GSK-3) (32). Dies ist das einzige bekannte Beispiel einer Proteinphosphatase, die durch eine Proteinkinase aktiviert wird. Allerdings ist die biologische Bedeutung dieses Vorgangs nur schwierig zu verstehen, da GSK-3 offensichtlich zwei entgegengesetzte Reaktionen katalysiert, nämlich die Inaktivierung der GS und die Aktivierung der PP-1, die ihrerseits die GS aktiviert.

Ad iii) Ein weiteres wichtiges Regulationsprinzip sind substratdirigierte Effekte (33): Damit beschreibt man Struktur- oder Konformationsänderungen eines potentiellen Phosphoproteins, die dieses gegenüber der Kinase oder Phosphatase besser oder weniger angreifbar machen. Oft kommen diese Änderungen durch Bindung niedermolekularer, meist allosterischer Effektoren an das Substratprotein zustande (s. S. 39).

Das zuletzt beschriebene Regulationsprinzip ist Gegenstand dieser Arbeit. Da die steady state-Konzentration des Glycogens sowohl von der Synthase als auch der Phosphorylase kontrolliert wird, erschien es sinnvoll zu untersuchen, ob die erhöhte Netto-Glycogensynthese trotz vermindertem Aktivierungsstatus der GS an einer gestörten Interaktion zwischen der GP und ihren Kontrollenzymen liegt. Trotz unveränderter GPP- und GPK-Aktivität im diabetischen Herzen könnte ein solcher Mechanismus die Glycogenanhäufung im Insulinmangel erklären. Deshalb wurden die Phosphorylase-Isoenzyme aus diabetischen Rattenherzen bis zur Homogenität gereinigt und die Phosphorylierung sowie die Dephosphorylierung kinetisch mit Hilfe exogener Phosphorylasekinase und Proteinphosphatase-1 untersucht.

Die Ziele dieser Arbeit lassen sich daher wie folgt zusammenfassen:
1) Zunächst sollte ein reproduzierbares Reinigungsverfahren für die Phosphorylasen aus Rattenherzen erarbeitet werden.
2) Mittels enzymologisch-proteinchemischer und immunologischer Methoden sollte überprüft werden, ob das Auftreten zweier Enzymformen präparationsbedingt ist oder ob das Rattenherz zwei verschiedene GP-Isoenzyme enthält.
3) Die in vitro-Regulation der Phosphorylasen aus diabetischen Rattenherzen durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung sollte stöchiometrisch und kinetisch analysiert und mit den Befunden für die Kontrollpräparationen verglichen werden.
4) Da Phosphorylasekinase in reiner Form zur Verfügung stand, nicht aber Proteinphosphatase-1 , umfaßt der vierte Komplex dieser Studie die Reinigung und Charakterisierung dieses Enzyms.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Amersham, England: (^{14}C)Glucose-1-phosphat, > 150 mCi/mmol; UDP-(^{14}C)Glucose, > 200 mCi/mmol; (γ-^{32}P)ATP, > 10 Ci/mmol

BIO-RAD, Richmond, CA, USA: Affigel Blue, Affigel-15, M_r Protein Standards für die SDS-PAGE, Silver Stain Kit

Boehringer-Mannheim: ATP, ADP, AMP, cAMP, Glucose-1-phosphat, Glucose-6-phosphat, Glucose-1,6-bisphosphat, UDP-Glucose, Glycogen, NADP und Streptocotozin. Phosphorylase a und b (Lyophilisat, 20 U/mg), Phosphoglucomutase (10 mg/ml, 200 U/mg), Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (Lyophilisat, 15 U/mg)

Dade, Miami, FA, USA: Lab-Trol Proteinstandard

Hoechst, Frankfurt am Main: Insulin CR

Miles Laboratories, Slough, England: BSA

Millipore, Bedford, MA, USA: Trypsin-TPCK

Pharmacia, Uppsala, Schweden: Agarose, DEAE-Sephacel, DEAE-Sepharose Fast Flow, DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-25, Sephadex G-75 superfine, AMP-Sepharose 4B, Heparin-Sepharose CL-6B; Mono Q prepacked column, Standardproteine zur Eichung von Gelfiltrationssäulen, nativen Polyacrylamid- und IEF-Gelen

Pierce, Rockford, IL, USA: Protein Assay Reagent, SDS

Serva Feinbiochemica, Heidelberg: Glycerin-1-phosphat, Imidazol, Norit A, Acrylamid, Bisacrylamid, Ammoniumpersulfat, TEMED, Coomassie Blue R-250 und G-250, Heparin

Sigma, St. Louis, MO, USA: Bicine, ACES, MES, Dithiothreitol, Harnstoff, Sulfosalicylsäure. Chymotrypsin-TLCK, Histon II-AS

Zinsser, Frankfurt am Main: Quickszint 212

Phosphorylasekinase, gereinigt aus Kaninchenmuskel nach Cohen (34), wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Heilmeyer, Ruhr-Universität Bochum, zur Verfügung gestellt.

Antiseren aus Kaninchen, Ziege und Schaf gegen Rattenskelettmuskel-

phosphorylase wurden freundlicherweise von Herrn P. Neubauer, Hoechst AG, Frankfurt am Main, produziert. Den Tieren wurden 150 ug Phosphorylase aus Rattenskelettmuskel pro kg Körpergewicht und nach 4 Wochen nochmals 50 ug pro kg Körpergewicht subkutan injiziert.

Alle anderen hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt, bezogen.

Pufferlösungen:
Puffer A: 20 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA (pH 7.4)
Puffer B: 5 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Ethandiol (pH 7.5)
Puffer C: 50 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Ethandiol (pH 7.5)
Puffer D: 500 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Ethandiol (pH 7.5)
Puffer E: 50 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA (pH 7.0)
Puffer F: 50 mM Tris/HCl, 1 mM DTT (pH 7.0)

2.2. Geräte und Maschinen

Photometer: Filterphotometer 1101M und 6114S, Eppendorf, Hamburg; Spektralphotometer Acta M-VI, Beckman, Palo Alto, CA, USA
Szintillationszähler: MR 300 dpm, Kontron, Zürich
Zentrifugen: Microfuge B und Ultrazentrifuge LS-65, Beckman; High Speed Centrifuge RC2-B, Sorvall, Norwalk, CN, USA; Minifuge GL, Heraeus-Christ, Osterode
Säulenchromatographie: Glassäulen: Pharmacia; Kunststoffsäulen Combichrom, Reichelt, Heidelberg; FPLC-Säulen: Bio-Sil TSK 250 und 400, BIO-RAD und Mono-Q HR 5/5, Pharmacia; Fraktionssammler SuperRac, LKB-Bromma, Schweden, Frac-100 und Frac-300, Pharmacia; Durchfluß-photometer Uvicord S 2, LKB; Kompensationsschreiber 2210, LKB; Peristaltische Pumpen Microperpex und Varioperpex II, LKB; Hochdruckpumpe M 302, Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich; Gradientenmischer Ultrograd und Dreiwegeventil, LKB
Elektrophorese: Vertikale Plattengelkammer Protean, Gradientenmischer 230, Geltrockner 224, BIO-RAD; Horizontale Kammer Multiphor, Power Supply 2103, Laser-Densitometer Ultroscan 2202, Integrator 2220, LKB; Diffusionsentfärber, Desaga, Heidelberg

Sonstiges: GF/C-Filter (2.5 cm Durchmesser), Whatman, England; Dialyseschläuche (Porengröße 1.5 - 2.0 nm), Union Carbide, Chicago, IL, USA; Einmal-Sterilfilter (Porengröße 0.45 und 0.80 um), Millipore; Konzentratoren Centricon-10, Ultrafiltrationszellen PM10 und 8050, YM-10 Membranen, Amicon, Lexington, MA, USA

2.3. Versuchstiere

Für Versuche mit Herzextrakten und experimentellem Diabetes wurden männliche Ratten des Stamms Bor.Wisw.Tno.Spf (Winkelmann,Borchen) im Alter von 3-5 Monaten mit einem Körpergewicht von 250-350 g verwendet. Alle Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser.
Experimenteller akuter (chronischer) Diabetes wurde erzeugt durch i.p.Injektion von Streptocotozin (90 bzw. 60 mg/kg Körpergewicht) in 90 mM Phosphat/55 mM Citrat (pH 4.5). Die diabetische Stoffwechsellage war gekennzeichnet durch Hyperglykämie, Glucosurie, (Ketonurie) sowie deutliche Gewichtsabnahme. 3 Tage (4 Wochen) nach der Streptocotozin-Applikation wurden die Tiere in Narkose durch Dekapitation getötet, die Herzen excisiert, in 0.9 % NaCl gewaschen und in flüssigem N_2 gelagert.
Für die Enzympräparationen wurden männliche Ratten aus eigener Zucht (2-4 Monate, 200-300 g) sowie Chinchilla-Kaninchen (Ivanovas, Kiesslegg) verwendet. Die Tiere wurden mit Nembutal betäubt und durch Entbluten getötet. Die Herzen bzw. die Skelettmuskulatur der Hinterbeine wurden entnommen und in flüssigem N_2 eingefroren.

2.4. Säulenchromatographie

Sofern nicht anders vermerkt, wurde die Extinktion eluierter Proteine bei 280 nm im Durchflußphotometer gemessen.

2.4.1. Ionenaustauschchromatographie

Die in gequollener Form gelieferten Gele DEAE-Sephacel und DEAE-Sepharose Fast Flow wurden in Kunststoffsäulen gefüllt und wie das fertiggepackte Gel Mono Q (5 x 50 mm) mit dem gewünschten Puffer

äquilibriert. Vor Aufgabe der Proben wurden diese gegen den Startpuffer dialysiert. Probenauftrag und Elution erfolgten bei konstanter Flußrate unter Pumpenkontrolle. Sobald die UV-Absorptionskurve auf die Basislinie zurückgekehrt war, wurden die gebundenen Proteine mit Hilfe eines maschinell geformten Gradienten eluiert (s. Ergebnisteil, Kap. 3.2.1. und 3.3.1.)

2.4.2. Gelfiltration

Sephadex G-75 superfine wurde bei Raumtemperatur in genügend Puffer vorgequollen, in eine Glassäule der Maße 1.6 x 100 cm gefüllt und mit mindestens 3 Bettvolumina desselben Puffers äquilibriert. Die Säule wurde mit Standardproteinen bekannten Molekulargewichts geeicht. Die Probe (partiell gereinigte Proteinphosphatase) wurde mit Hilfe eines Probenaufgabeventils aufgetragen und bei konstantem Fluß (7.6 ml/h) getrennt.

Das Molekulargewicht gereinigter Phosphorylasen bzw. Proteinphosphatase-1 wurde durch analytische FPLC-Gelfiltration an Bio-Sil TSK 400 (7.5 x 600 mm), äquilibriert mit 0.1 M NaH_2PO_4/NaOH (pH 6.8) bzw. TSK 250 (7.5 x 600 mm), äquilibriert mit Puffer C + 0.5 M NaCl, bestimmt. Vor die Trennsäule wurde eine Vorsäule (7.5 x 70 mm) plaziert. 50 ul ^{32}P-Phosphorylase a oder Phosphorylase b bzw. 200 ul Proteinphosphatase-1 wurden mit Hilfe eines Rheodyne-Ventils und einer Probenschleife aufgegeben. Der hydrostatische Druck betrug 200 psi, die Flußrate 1 (0.1) ml/min. Die Aufzeichnung eluierter Proteine erfolgte bei 206 nm, die Peakflächen wurden automatisch integriert. In Aliquots der gesammelten Fraktionen (0.25 ml) wurden die Enzymaktivität und ggf. die Radioaktivität bestimmt.

2.4.3. Affinitätschromatographie

Die in gefriergetrockneter Form gelieferten Gele AMP-Sepharose 4B und Heparin-Sepharose CL-6B wurden gemäß Herstellerangaben vorgequollen, mit Startpuffer gewaschen, in eine Säule gefüllt und mit 50 Bettvolumina des Puffers äquilibriert.

Das gebrauchsfertige Affigel Blue wurde in der Säule solange gewaschen, bis das Effluat keine Extinktion mehr aufwies.

Phosphorylase-b-Agarose:
Für die kovalente Bindung des Liganden an das Gel wurden 150 mg KSM-GP (s. 2.5.1.) in 8 ml 0.1 M $NaHCO_3$ (pH 8.5) mit 5 ml Affigel-15 4 h bei 4oC inkubiert. Zur Blockierung überschüssiger reaktiver Gruppen wurde der Suspension 0.5 ml 1 M Ethanolamin/HCl (pH 8.0) zugegeben und 1 h weiterinkubiert. Das Gel wurde anschließend in eine Säule (1.14 x 6 cm) gefüllt und über Nacht mit aq. dest. gewaschen. Die Proteinbestimmung in der Waschfraktion ergab, daß ca. 140 mg Phosphorylase an das Gel gebunden hatten.

Die Laufbedingungen der einzelnen Säulen sind in den Beschreibungen der Proteinpräparationen enthalten.

2.5. Proteinpräparationen

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Schritte bei 4 °C durchgeführt.

2.5.1. Phosphorylase b aus Kaninchenskelettmuskel

Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel wurde nach der Methode von Fischer und Krebs (35) gereinigt.
Aus einem mit Wasser gewonnenen Rohextrakt wurden die myofibrillären Proteine bei pH 5.2 ausgefällt. Der mit $KHCO_3$ neutralisierte Überstand wurde mit 40 % Ammoniumsulfat versetzt, das Pellet in aq. resuspendiert, zunächst 3 h gegen aq., dann über Nacht gegen 1 mM Tris dialysiert. Anschließend wurde die Proteinlösung auf 28 mM Mercaptoethanol und 0.5 mM EDTA gebracht und 1 h bei 37 °C und pH 8.8 inkubiert. Hierdurch werden kontaminierende Proteine, so auch GPK und PP, denaturiert und evtl. vorhandene GP a in die b-Form überführt. Die denaturierten Proteine wurden nach dem Abkühlen abzentrifugiert, die lösliche GP in Gegenwart von Magnesiumacetat und 1 mM AMP über Nacht auskristallisiert. Die Kristallsuspension wurde in

der Kälte abzentrifugiert, in 10 mM Tris/o.2 % Mercaptoethanol aufgenommen, homogenisiert und bei 3o °C zentrifugiert. Die Kristallisation der nun gelösten GP in Gegenwart von Mg^{2+} und AMP wurde noch zweimal wiederholt. Schließlich wurden die GP-Kristalle in 2o mM Glycerin-1-phosphat/50 mM Mercaptoethanol (pH 7.0) aufgenommen, bei 30 °C gelöst und zur Entfernung des AMP über eine kleine Säule, die mit Aktivkohle (Norit A) gefüllt war, filtriert. Der Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 nm war < 0.54, was als zuverlässiges Kriterium für die Nucleotidfreiheit der Präparation angesehen wird (35). Das Endprodukt wurde gegen den o.a.Puffer + 50 % Glycerin dialysiert und bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.2. Phosphorylase b aus Rattenherz und -skelettmuskel

Abgesehen von kleinen Modifikationen erfolgte die Reinigung wie in Ref. 36 angegeben:

Schritt 1: Gefrorene Rattenherzen (ca. 100 g) wurden in 6 Vol. Puffer A aufgenommen und 2 min im Waring-Blendor homogenisiert.

Schritt 2: Das Homogenat wurde 20 min bei 8000 g zentrifugiert, der Überstand durch Glaswolle filtriert und mit 2 M Tris wieder auf pH 7.4 gebracht. Da sich bis zu 25 % der ursprünglichen Aktivität im Sediment wiederfanden, wurde das Enzym durch eine zweite Zentrifugation nochmals extrahiert.

Schritt 3: Die vereinigten Überstände von Schritt 2 wurden unter pH-Kontrolle langsam mit festem Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 50 % versetzt. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation (20,000 g, 20 min) gesammelt und in Puffer A resuspendiert. Die Suspension wurde über Nacht zweimal gegen 40 50 Vol. Puffer A dialysiert. Das Dialysat wurde dann 1 h bei 70,000 g zentrifugiert, um unlösliche Proteine zu entfernen.

Schritt 4: Der klare Überstand wurde auf eine DEAE-Sepharose Fast Flow Säule (3 x 22 cm), äquilibriert mit Puffer A, aufgetragen. Die Säule wurde mit diesem Puffer bis zur vollständigen Elution ungebundener Proteine gewaschen. In diesen Fraktionen war keine GP-Aktivität nachweisbar. Ein angepaßter linearer Gradient von 0-0.3 M NaCl in Puffer A eluierte 2 GP-Peaks (Abb. 10), die getrennt weiterverar-

beitet wurden.
Schritt 5: Die aktiven Fraktionen wurden anschließend auf je eine AMP-Sepharose Säule (1.14 x 8 cm), äquilibriert mit Puffer A, aufgetragen. Beide Säulen wurden mit Hilfe einer Zweikanal-Schlauchpumpe mit identischen Flußraten (ca. 30 ml/h) gleichzeitig betrieben. Um nichtgebundene Proteine zu entfernen, wurden die Säulen mit Puffer A, dann mit 0.3 M NaCl in Puffer A gewaschen. Bis hierhin enthielten die Fraktionen keine nennenswerte GP-Aktivität. Beide GP-Species wurden mit 10 mM AMP in Puffer A eluiert (s. Abb. 11).
Die aktiven Fraktionen wurden kontinuierlich in einer Amicon-Ultrafiltrationszelle, ausgerüstet mit einer YM-10 Membran, konzentriert und AMP-frei dialysiert (s. 2.5.1.). Die Enzymlösungen wurden bis zu einer Endkonzentration von 50 % (v/v) mit Glycerin versetzt und bei -20 °C aufbewahrt.

Die Reinigungsprozedur für die Rattenskelettmuskelphosphorylase entspricht dem eben beschriebenen Verfahren, außer daß der letzte Schritt, die Affinitätschromatographie, nicht benötigt wurde.

2.5.3. Proteinphosphatase-1 aus Kaninchenskelettmuskel

Zur Reinigung dieses Enzyms wurden mehrere Verfahren erprobt, deren Ergebnisse, Vor- und Nachteile in Abschnitt 3.2.1. erörtert werden. Hier wird das Verfahren beschrieben, dessen Endprodukt für die sich anschließenden Versuche verwendet wurde.

Schritt 1: 185 g Skelettmuskulatur wurden in 600 ml 20 mM Tris/HCl, 4 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.25 M Saccharose (pH 7.0) homogenisiert.
Schritt 2: Die PP-Aktivität wurde mittels Zentrifugation (6000 g, 45 min) extrahiert. Der pH des durch Glaswolle filtrierten Überstandes wurde mit 10 M NH_4OH von ca. 6 auf 7.5 eingestellt.
Schritt 3: Der Rohextrakt wurde langsam auf einen Sättigungsgrad von 35 % Ammoniumsulfat gebracht, währenddessen der pH-Wert mit 2 M Tris nachjustiert wurde. Die gefällten Proteine wurden abzentrifugiert (10,000 g, 15 min), in einem minimalen Vol. Puffer B resuspendiert und über eine Sephadex G-25 Säule (2.4 x 24 cm) entsalzt. Die Pro-

teinsuspension wurde 1 h bei 50,000 g zentrifugiert und der Überstand filtriert (0.8 um Porenweite).

Schritt 4: Das klare Filtrat wurde an DEAE-Sepharose Fast Flow (3 x 20 cm), äquilibriert mit Puffer C, chromatographiert. Nach Elution der ungebundenen Proteine, die keine PP-Aktivität enthielten, wurde ein linearer Gradient von Puffer C-D (50-500 mM Tris) angelegt. Die PP wurde in einem singulären Peak eluiert (Abb. 2). Die vereinigten aktiven Fraktionen wurden nach Dialyse gegen Puffer C an DEAE-Sephacel (2.5 x 3 cm) gebunden und mit Puffer D in einem Vol. von 4.0 ml eluiert.

Schritt 5: Die konzentrierte Enzymlösung wurde via Sephadex G-75 superfine (1.6 x 95 cm), äquilibriert mit Puffer C + 0.1 M NaCl, bei einer Flußrate von 8.0 ml/h gelfiltriert (Abb. 3).

Schritt 6: Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose CL-6B: Nach Gergely et al. (37) bindet Heparin lediglich PP-1, nicht jedoch PP-2. Die Säule (1.14 x 6 cm) war mit Puffer C äquilibriert und wurde mit einer Flußrate von 20 ml/h gefahren. In der Breakthrough-Fraktion fanden sich ca. 10 % der aufgetragenen PP-Aktivität. PP-1 wurde mit einem linearen Gradienten von 0-0.5 M NaCl in Puffer C eluiert (Abb. 4).

Abschließend wurden die aktiven Fraktionen gegen 50 mM Tris, 1 mM DTT, 50 % (v/v) Ethandiol (pH 7.5) dialysiert und dann bei -20°C gelagert.

2.6. Präparation ^{32}P-markierter Phosphorylase a

Das Substrat für die Proteinphosphatase, ^{32}P-Phosphorylase a, wurde mittels Inkubation von Kaninchenmuskelphosphorylase b mit Phosphorylasekinase und (γ-^{32}P)ATP hergestellt (38).

Phosphorylase b (5 mg/ml) wurde in einem Puffer, bestehend aus 50 mM Tris, 50 mM Glycerin-1-phosphat (pH 8.6), 10 mM Mg-Acetat, 1 mM ATP (pH 7.0, spezifische Radioaktivität 10^8 cpm/umol) sowie Phosphorylasekinase (6 ug/mg Phosphorylase) 1 h bei 30°C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe eines gleichgroßen Vol. 90 % Ammoniumsulfat (pH 7.0) beendet. Das durch Zentrifugation erhaltene Präzipitat wurde in Puffer E + 45 % ges. Ammoniumsulfat gewaschen, dann

in 1-2 ml Puffer E gelöst und zweimal 8 h gegen 1000 Vol. Puffer E dialysiert. Die dabei entstandenen GP-Kristalle wurden bei 10,000 g und 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann bei 30 °C in Puffer E + 250 mM NaCl gelöst und filtriert (0.8 um Porenweite).
Die Konzentration der GP a wurde bei 280 nm gemessen (s. 2.6.) und betrug in der Regel 12 bis 15 mg/ml. Der Quotient aus den spezifischen Radioaktivitäten des proteingebundenen Phosphats und des angebotenen (γ-^{32}P)ATP gibt den Grad der Phosphorylierung an. Dieser lag zwischen 0.93 und 0.98 mol P_i/mol Enzymuntereinheit (M_r = 97,400).

Das Volumen des Reaktionsansatzes wurde so gewählt, daß genügend Substrat für 4 Wochen (ca. 2 Halbwertszeiten) vorhanden war. In dieser Zeit nahm die spezifische Radioaktivität der GP von ca. 100 auf 25 cpm/pmol ab, die spontane Phosphatabspaltung war < 1 %.
^{32}P-GP a wurde als kristalline Suspension bei 4 °C aufbewahrt. Kurz vor Gebrauch wurde die benötigte Menge bei 30 °C gelöst und mit Puffer F auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

2.7. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration in Lösungen wurde nach Bradford (39) mit Lab-Trol als Standard bestimmt.
Die Konzentration reiner Phosphorylase wurde bei 280 nm unter Zugrundelegung eines Absorptionskoeffizienten von 13.1 für eine 1%ige Phosphorylase-Lösung (40) gemessen.

2.8. Enzymassays

Alle Enzymaktivitätsmessungen wurden bei 30 °C ausgeführt. 1 Unit Enzymaktivität ist definiert als Umsatz von 1 umol (GP, GS) bzw. 1 nmol (PK, GPK, PP) Substrat pro min.

2.8.1. Glycogenphosphorylase (E.C. 2.4.1.1)

Die GP-Aktivität wurde routinemäßig im gekoppelten optischen Test in Richtung Glycogenabbau gemessen (41).

Der Testansatz enthielt in 1 ml folgende Komponenten:

Kaliumphosphatpuffer (pH 6.8)	50.0 mM
$MgCl_2$	15.0 mM
EDTA	0.1 mM
Glycogen	13.0 mM (= 2.45 mg/ml)
NADP	0.85 mM
Glucose-1,6-bisphosphat	6.0 uM
Phosphoglucomutase	5 units/ml
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	5 units/ml
-/+ AMP	1.0 mM

Spontan aktive GP a wird in Abwesenheit, die spontan inaktive GP b in Anwesenheit des allosterischen Aktivators AMP gemessen (1,2,42). Der Aktivitätsstatus des Enzyms (% Phosphorylase a) ergibt sich somit aus dem Quotienten (Aktivität in Abwesenheit von AMP x 100)/Aktivität in Gegenwart von AMP.

In kinetischen Messungen, bei denen die P_i-Konzentration variiert wurde, diente als Puffersubstanz 40 mM Imidazol/HCl (pH 6.8) (43).

Zur Abschätzung kinetischer Konstanten wurde die GP-Aktivität auch in Richtung Glycogensynthese gemessen (44). Dabei wird der Einbau von ^{14}C-Glucose aus ^{14}C-Glucose-1-phosphat in die Glycogenfraktion bestimmt.

Der Testansatz (0.1 ml) bestand aus:

Imidazol/HCl (pH 6.8)	40.0 mM
EDTA	1.0 mM
DTT	0.5 mM
Glucose-1-phosphat	60.0 mM (ca. 20000 dpm/umol)
Glycogen	32.1 mM (= 6 mg/ml)
-/+ AMP	1.0 mM

Nach Beendigung der Inkubationszeit (< 20 min) wurden je 90 ul des Reaktionsansatzes auf ein GF/C-Filter gegeben und in eisgekühltes 66 % (v/v) Ethanol überführt. Die Filter wurden insgesamt viermal in 66 % Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend im ß-Counter gezählt.

2.8.2. Glycogensynthase (E.C. 2.4.1.11)

Die GS-Aktivität wurde modifiziert nach Thomas et al. (45) bestimmt. Dabei wird der Einbau von ^{14}C-Glucose aus UDP-^{14}C-Glucose in die Glycogenfraktion gemessen.

Die Endkonzentrationen im Test (0.1 ml) betrugen:

	Tris/HCl (pH 7.8)	50.0 mM
	EDTA	5.0 mM
	NaF	100.0 mM
	UDP-Glucose	6.7 mM (ca. 80000 dpm/umol)
	Glycogen	35.9 mM (= 6.7 mg/ml)
-/+	Glucose-6-phosphat	6.7 mM

In Anwesenheit des allosterischen Aktivators Glucose-6-phosphat wird neben der spontan aktiven dephosphorylierten a-Form auch die inaktive phosphorylierte b-Form der GS erfaßt (46).

Nach 10 min Inkubationszeit wurde die Reaktion wie in 2.8.1. angegeben beendet und ebenso weiterverarbeitet.

2.8.3. cAMP-abhängige Proteinkinase (E.C. 2.7.1.37)

Die PK-Aktivität wurde mit Hilfe des Filterpapier-Assays nach Gill & Walton (47) mit Histon als Substrat gemessen.

In 50 ul Testvolumen waren gelöst:

	Kaliumphosphatpuffer (pH 6.8)	30 mM
	DTT	2 mM
	$MgCl_2$	10 mM
	Histon II-AS	10 mg/ml
	ATP (pH 7.0, 4×10^7 cpm/umol)	5 mM
-/+	cAMP	2 uM

Die Proteinkinase bildet ein tetrameres, inaktives Holoenzym aus zwei jeweils identischen katalytischen und regulatorischen Untereinheiten (R_2C_2); Bindung von cAMP an R führt zur Freisetzung der aktiven katalytischen Untereinheit (48). Der -/+ cAMP-Quotient gibt den

Aktivierungsstatus des Enzyms wieder (11).
Nach 10 min Inkubationszeit wurden 40 ul des Ansatzes auf GF/C-Filter pipettiert und nacheinander je 15 min in 10 % (w/v) TCA, dreimal in 5 % TCA, 95 % (v/v) Ethanol, Ethanol:Diethylether (1:1) und Diethylether gewaschen, getrocknet und in 3 ml Quickszint 212 gezählt.

2.8.4. Phosphorylasekinase (E.C. 2.7.1.38)

Die GPK-Aktivität wurde in einem Ansatz ähnlich dem in 2.8.3. bestimmt.
In 50 ul Testvolumen waren gelöst:

Tris/Glycerin-1-phosphat (pH 6.8 oder 8.2)	je 50 mM
DTT	1 mM
$CaCl_2$	100 uM
$MgCl_2$	20 mM
Phosphorylase b	5 mg/ml
ATP (pH 7.0, 5 x 10^7 bis 10^8 cpm/umol)	5 mM

Bei pH 6.8 wird die aktive phosphorylierte, bei pH 8.2 auch die inaktive dephosphorylierte Form des Enzyms erfaßt (49).
Nach 2 bis 8 min Inkubationszeit wurde die Reaktion beendet und wie in 2.8.3. weiterverarbeitet.

2.8.5. Proteinphosphatase (E.C. 3.1.3.16)

Die PP-Aktivität wurde mit ^{32}P-markierter Phosphorylase a aus Kaninchenmuskel (siehe 2.6.) als Substrat gemessen (50,51).
PP, verdünnt in Puffer F + 1 mg/ml BSA, sowie die Substratlösung wurden 10 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von ^{32}P-Phosphorylase a.
In einem Testvolumen von 60 ul waren enthalten:

Tris/HCl (pH 7.0)	50 mM
DTT	1 mM
BSA	0.33 mg/ml
Theophyllin	5 mM
^{32}P-Phosphorylase a	1 mg/ml (10.2 uM, 25-100 cpm/pmol)

In Gegenwart von Heparin (250 ug/ml) wird die Proteinphosphatase-1 zu mehr als 95 % gehemmt (s.3.2.2., 52); auf die Aktivität der PP-2A dagegen hat Heparin keinen Einfluß (37,52). Diese Substanz wurde demzufolge wie Inhibitor-2 (27) benutzt, um zwischen PP-1 und PP-2A zu differenzieren. Die PP-1-Aktivität wurde bestimmt, indem die PP-Aktivität in Gegenwart von Heparin von der PP-Aktivität in Abwesenheit dieses Effektors subtrahiert wurde. Die PP-Aktivität in Gegenwart von Heparin wurde als PP-2A bezeichnet.
Das Enzym wurde so verdünnt, daß innerhalb der Inkubationszeit (10 min) nicht mehr als 40 % des proteingebundenen P_i hydrolysiert wurden. Unter diesen Bedingungen war der Reaktionsverlauf proportional zur Zeit und der Proteinkonzentration.
Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von je 100 ul 20 % (w/v) TCA und 6 mg/ml BSA. Nach Abzentrifugation der gefällten Proteine (10,000 g, 3 min) wurde ein Aliquot des Überstandes mit Quickszint 212 versetzt und im ß-Counter gezählt.
Da auch Trypsin oder trypsinähnliche Proteasen durch Abspaltung niedermolekularer Peptide, die das Phosphoserin enthalten, TCA-lösliche Radioaktivität produzieren können (vgl. 3.7.1., 53), wurde in einigen Fällen spezifisch das freigesetzte anorganische Phosphat modifiziert nach Antoniw und Cohen (54) gemessen:
0.1 ml des TCA-Überstandes wurden nacheinander mit 0.2 ml 1.25 mM KH_2PO_4 in 1 N H_2SO_4, 0.5 ml Isobutanol:Toluol (1:1) und 0.1 ml 5 % (w/v) Ammoniummolybdat vermischt. Organische und anorganische Phase wurden durch kurze Zentrifugation (4 min, 10,000 g) getrennt. Ein Aliquot (0.3 ml) der oberen organischen Phase wurde zu 3 ml Quickszint 212 gegeben und im ß-Counter gezählt.

2.9. Elektrophoretische Methoden

2.9.1. Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Chua (55)

Es wurden Flachgele der Dimension 160 x 140 x 1.5 mm verwendet. Für die Herstellung dreier identischer Trenngele wurden folgende Lösungen gemischt:

	Polyacrylamid-Eckkonzentrationen		
	5 %	10 %	20 %
30 % (w/v) Acrylamid/Bis[1]	7.5 ml	15.0 ml	-------
60 % (w/v) Acrylamid/Bis[1]	-------	-------	15.0 ml
60 % (w/v) Saccharose	2.2 ml	6.0 ml	-------
80 % (w/v) Saccharose	-------	-------	12.5 ml
5X Trenngelpuffer[2]	9.0 ml	9.0 ml	9.0 ml
10 % (w/v) SDS	450 ul	450 ul	450 ul
aq. dest.	25.7 ml	14.4 ml	7.9 ml
10 % (w/v) APS	150 ul	150 ul	150 ul
TEMED	30 ul	30 ul	15 ul

[1] Quervernetzungsgrad: 3.5 %, d.h. 3.5 g Bisacrylamid pro 100 g Acrylamid + Bisacrylamid

[2] Trenngelpuffer = Unterer Kammerpuffer 5-fach konzentriert angesetzt: 2.122 M Tris/HCl (pH 9.14)

Die beiden Lösungen wurden aus einem Gradientenmischer mittels Pumpe von unten in die Gelsandwiches befördert, die zu einem kleinen Teil mit 1 % SDS gefüllt waren. Nach der Polymerisation wurde die SDS-Lösung abgesaugt und das Sammelgel daraufgegossen. Dieses hatte folgende Zusammensetzung:

30 % (w/v) Acrylamid/Bis	3.0 ml
Sammelgelpuffer[1]	7.5 ml
10 % (w/v) SDS	0.3 ml
aq. dest.	18.9 ml
10 % (w/v) APS	0.3 ml
TEMED	30 ul

[1] Sammelgelpuffer: 50 mM Tris/H_2SO_4 (pH 6.4)

Weitere für die SDS-PAGE benutzte Lösungen:
Oberer Kammerpuffer = 0.041 M Tris/Borat, 0.1 % SDS (pH 8.64)
Probenpuffer = 50 mM Tris/HCl, 2 % SDS, 10 % Saccharose, 50 mM DTT, fakultativ 9 M Harnstoff (pH 7.5)

Die Proteine wurden in Probenpuffer mindestens 5 min bei 100 °C erhitzt.
Die Elektrophorese wurde bei konstanter Stromstärke (9 mA pro Gel) über 16 h durchgeführt. Die Färbung der Gele erfolgte in 0.1 % (w/v) Coomassie Blue R-250 in einer Lösung aus 43 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure und 2 % (v/v) Glycerin für 1 h bei Raumtemperatur, die Entfärbung in derselben Lösung ohne Farbstoff.
In einigen Fällen wurde die Silberfärbung nach Switzer et al. (56) gemäß Herstellerangaben (BIO-RAD) angewandt.

2.9.2. Kontinuierliche Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen (N-PAGE)

Zur Bestimmung des Molekulargewichts oligomerer Proteine wurde die Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese in einem kontinuierlichen System nach Rothe (57-59) benutzt. Es wurden ebenfalls Flachgele mit den Abmessungen 160 x 140 x 1.5 mm verwendet. Folgende Lösungen wurden für drei Gradientengele gemischt:

	Polyacrylamid-Eckkonzentrationen	
	5 %	30 %
30 % (w/v) Acrylamid/Bis	5.35 ml	--------
60 % (w/v) Acrylamid/Bis	--------	16.00 ml
60 % (w/v) Saccharose	1.60 ml	--------
80 % (w/v) Saccharose	--------	12.70 ml
1 M Tris/HCl (pH 9.0)	3.20 ml	3.20 ml
aq. dest.	21.75 ml	--------
10 % (w/v) APS	0.10 ml	0.10 ml
TEMED	0.02 ml	0.01 ml

Die Gele wurden wie unter 2.9.1. beschrieben hergestellt, außer daß sie mit aq. dest. überschichtet waren.
Die Proben wurden nach einer Präelektrophorese (30 min, 60 V) aufgetragen. Als Probenpuffer diente 0.1 M Tris/HCl (pH 9.0) + 20 % (w/v) Saccharose. Die Elektrophorese lief bei 5 °C und konstanter Spannung von 300 V über 6 h.

Färbung und Entfärbung der Proteine wurde wie in 2.9.1. angegeben durchgeführt.

2.9.3. Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung wurde im horizontalen Flachgelsystem mit kommerziell erhältlichen Fertiggelen (LKB PAG-Plates, pH 3.5 - 9.5) durchgeführt.
Die Proteinproben wurden so mit aq. dest. verdünnt, daß für die Proteinanfärbung (s.u.) 2 ug/15 ul und für die Aktivitätsanfärbung (s. 2.9.4.) 40 mUnits/15 ul aufgetragen werden konnten. Zur Markierung des pH-Gradienten wurde der Broad pI Standard von Pharmacia verwendet.
Das Gel wurde bei konstanter Leistung (30 W) bis zu einer maximalen Spannung von ca. 1500 V für etwa 1.5 h gefahren. Anoden- und Kathodenflüssigkeit waren 1 M H_3PO_4 und 1 M NaOH.
Fixierung, Färbung und Entfärbung erfolgte nach der Methode von Vesterberg et al. (60): Das Gel wurde zunächst 30 min bei 60 °C in einer Lösung aus 9 g Sulfosalicylsäure und 30 g TCA ad 200 ml aq. dest. fixiert und dann bei der gleichen Temperatur in einer Lösung aus 0.04 % (w/v) Coomassie Blue G-250, 6 % (w/v) Harnstoff, 2 % (v/v) $HClO_4$ für 30 min gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in 10 % (v/v) Ethylacetat, 5 % (v/v) Essigsäure, 7 % (v/v) Ethanol.

2.9.4. Anfärbung der Phosphorylase-Aktivität in Polyacrylamidgelen

Elektrophorierte Gele (IEF oder N-PAGE) wurden in einer Lösung, bestehend aus 50 mM Imidazol/HCl (pH 6.8), 1 % (w/v) Glycogen, 20 mM Glucose-1-phosphat -/+ 2 mM AMP 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Das gebildete Glycogen wurde durch kurzes Eintauchen des Gels in 10 mM J_2/14 mM KJ sichtbar gemacht. Die Färbung der Bande verblaßte in aq. dest. und 7.5 % Essigsäure nach mehreren Stunden , war jedoch in 20 % (v/v) Ethanol haltbar.
Eine Proportionalität zwischen der aufgetragenen Enzymaktivität und der Färbeintensität war nicht zu beobachten. Die Nachweisgrenze lag bei etwa 10 mUnits.

2.10. Immunologische Analysen

Die Charakterisierung der Antiseren gegen Rattenskelettmuskel-Phosphorylase wurde immunelektrophoretisch mit Hilfe eines Reagenziensatzes und fertiger Elektrophoresekammern (Immuno AG, Wien) vorgenommen.
Die radiale Immundiffusion nach Ouchterlony (61) wurde in 1%igen Agarosegelen durchgeführt.

Die aktivitätshemmende Wirkung der Antiseren wurde durch Inkubation von je 40 U/ml Phosphorylase (Endkonzentration) mit steigenden Verdünnungen des Antiserums (4 °C, 16 h) untersucht. In diesen Ansätzen wurde dann die Restaktivität bestimmt. Um eine während der Inkubationszeit fragliche Aktivitätsabnahme zu erfassen, wurden Kontrollen mit Kontrollseren durchgeführt.

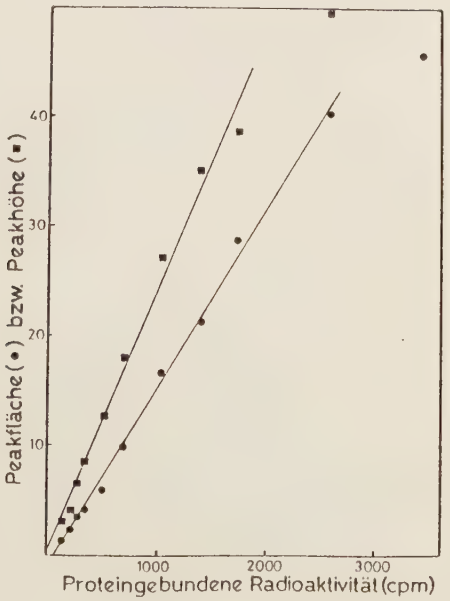


Abb. 1: Eichung der Autoradiographie: Auf ein SDS-Gel wurden nebeneinander steigende Mengen ^{32}P-Phosphorylase a aufgetragen. Das hieraus resultierende Autoradiogramm wurde mit dem ULTROSCAN densitometrisch analysiert. Peakhöhe (Schwärzungsintensität) und Peakfläche (Schwärzungsausmaß) wurden gegen die phosphorylase-gebundene ^{32}P-Radioaktivität aufgetragen

2.11. Autoradiographie

In SDS-Gelen aufgetrennte ^{32}P-markierte Proteine oder Peptide wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Gele wurden nach der Entfärbung vakuumgetrocknet und für 24 h bei -80 °C auf einen Kodak X-Omat AR Röntgenfilm (13 x 18 cm) gelegt. Entwicklung und Fixierung des Films erfolgte nach Herstellerangaben.

Damit Unterschiede im Phosphorylierungsgrad zweier Proteine als solche erkannt werden konnten, wurde auf einem Gel nur ^{32}P-Phosphorylase a in zunehmender Menge nebeneinander elektrophoriert. Gel und Autoradiogramm wurden anschließend densitometrisch analysiert. Sowohl die Schwärzungsintensität (Peakhöhe) als auch die Gesamtschwärzung (Peakfläche) waren über einen weiten Bereich proportional zu der auf das Gel aufgetragenen proteingebundenen Radioaktivität, die im ß-Counter bestimmt wurde (Abb. 1).

2.12. Interkonversionsreaktionen

2.12.1. Phosphorylierung der Phosphorylase b

Der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung der Phosphorylase b und die damit einhergehende Enzymaktivierung wurden analysiert.
Der Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

Tris/Glycerin-1-phosphat (pH 8.6)	je 50 mM
DTT	1 mM
$CaCl_2$	100 uM
$MgCl_2$	20 mM
Phosphorylase b	180 ug/ml
ATP (pH 7.0, 50-60 x 10^6 cpm/umol)	5 mM
Phosphorylasekinase (2.5 ug/mg Phosphorylase)	

in einem Volumen von 0.45 ml und wurde bis zu 60 min bei 30 °C inkubiert. Der pH betrug 8.2. In einem Ansatz ohne Phosphorylase wurde die Autophosphorylierung der Kinase erfaßt.
Zu bestimmten Zeiten wurden Aliquots aus dem Reaktionsansatz entnommen und je nach geplantem Test weiterverarbeitet:

Zur Messung des Phosphateinbaus wurden 20 ul auf ein GF/C-Filter pipettiert und nacheinander zweimal 15 min in 10 % (w/v) TCA, je einmal 15 min in 5 % TCA, Ethanol, Diethylether:Ethanol (1:1) und Diethylether gewaschen, bei 60 °C getrocknet und nach Zugabe von 3 ml Quickszint 212 im ß-Counter gezählt.

Zur Messung der Enzymaktivität wurden aliquote Teile des Reaktionsansatzes mit eiskaltem Puffer (50 mM Tris/HCl, 1 mM DTT, 4 mM EDTA, 100 mM NaF, pH 7.4) 1:20 verdünnt. In diesen Ansätzen wurde die GP-Aktivität ohne und mit 1 mM AMP bestimmt.

Für die SDS-PAGE mit nachfolgender Autoradiographie wurden je 10 ul des Reaktionsansatzes (= 1.8 ug Phosphorylase) mit SDS-Probenpuffer (s. 2.9.1.) 5 min bei 100 °C erhitzt und später elektrophoriert.

Berechnung der in die Phosphorylase eingebaute Phosphatmenge:

1) Pro Filter gebundene Phosphorylasemenge X in nmol:

$$X = (GP) \times A \times R / M_r$$

wobei (GP): Konzentration der GP in mg/ml
A: Vol. des Aliquots auf dem Filter in ml
R: Reinheit der Präparation in Bruchteilen von 1
M_r: Molekulargewicht 97.4 mg/nmol

2) Pro Phosphorylase-Untereinheit gebundenes Phosphat P/GP:

$$P/GP = RA_F / (RA_s \times X)$$

wobei RA_F: auf dem Filter gemessene Radioaktivität in cpm
RA_s: Spezifische Radioaktivität des ATP in cpm/nmol

Autophosphorylierung der Kinase sowie der Leerwert (unspezifische Bindung von Radioaktivität an den Filter) wurden subtrahiert.

2.12.2. Dephosphorylierung der ^{32}P-Phosphorylase a

Die verschiedenen GP-Isoenzyme, frisch mit ^{32}P markiert, wurden mit Hilfe der aus Kaninchenskelettmuskel gereinigten Proteinphosphatase dephosphoryliert und inaktiviert.
Ein geeignetes Verhältnis zwischen Enzym- und Substratprotein wurde in einem Vorversuch untersucht (s. 3.6.4.).
Der Reaktionsansatz bestand aus:

Tris/HCl (pH 7.0)	50 mM
DTT	1 mM
BSA	0.33 mg/ml
^{32}P-Phosphorylase a	100 bzw. 200 ug/ml, 1250 cpm/ug
Proteinphosphatase	(variiert, s. Ergebnisse)
-/+ Theophyllin	5 mM

und wurde bis zu 60 min bei 30°C inkubiert.

Zu bestimmten Zeiten wurden Aliquots aus dem Reaktionsansatz entnommen und auf TCA-lösliche Radioaktivität, d.h. freigesetztes P_i (s. 2.8.5.) bzw. Enzymaktivität (ohne und mit 1 mM AMP, s. 2.12.1.) untersucht.

2.13. Peptide Mapping

Bestimmte Mengen der gereinigten Phosphorylase-Isoenzyme wurden in 50 mM Tris, 1 mM DTT (pH 8.2) verdünnt und mittels Centricon-10 auf das minimale Volumen (ca. 40 ul) eingeengt. Anschließend wurde das Enzym - in SDS-Probenpuffer (s. 2.9.1.) denaturiert oder nativ - mit Protease (Chymotrypsin bzw. Trypsin) bei 30°C zeit- oder konzentrationsabhängig inkubiert.
Der Reaktionsansatz bestand aus:

Tris/HCl (pH 8.2)	50 mM
DTT	1 mM
$CaCl_2$	1 mM
SDS	< 0.5 % (w/v)
Phosphorylase b	0.5 mg/ml
bzw. ^{32}P-Phosphorylase a	0.2 bzw. 0.1 mg/ml

und frisch angesetzter Proteaselösung. Das Massenverhältnis Enzym:Substrat betrug bei der Zeitabhängigkeit 1:1000, 1:500 oder 1:250, bei der Konzentrationsabhängigkeit wurde es von 1:1000 bis 1:50 variiert.
Aliquote Teile des Reaktionsansatzes wurden zu verschiedenen Zeiten mit SDS-Probenpuffer (s. 2.9.1.) hitzedenaturiert und auf ein SDS-Polyacrylamidgel (10 bis 20 % Acrylamid) aufgetragen. Die Elektrophoresebedingungen sind in 2.9.1. beschrieben.
Im Falle der ^{32}P-Phosphorylase a wurde auch die TCA-lösliche Radioaktivität analog zu dem Verfahren in 2.8.5. (entsprechend Spaltpeptiden mit $M_r < 6000$) bestimmt und eine Autoradiographie (s. 2.11.) angeschlossen.

2.14. Berechnungen und Statistik

Ergebnisse wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichung des Mittelwertes angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test nach Student (62) geprüft. Als Signifikanzgrenze wurde $p < 0.05$ gewählt.
Geradengleichungen vom Typ $y = a + bx$ sowie der Korrelationskoeffizient r wurden mit Hilfe eines Taschenrechner-Programms ermittelt.
Die Berechnung enzymkinetischer Konstanten und Koeffizienten erfolgte nach Lineweaver und Burk (63).

3. Ergebnisse

Bevor auf das eigentliche Ziel dieser Arbeit, die Phosphorylasen aus Rattenherz, eingegangen wird, sollen zunächst die Präparationen der benötigten "Werkzeugenzyme", nämlich der Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel sowie der Proteinphosphatase-1 aus Kaninchenmuskel beschrieben werden.

3.1. Präparation der Phosphorylase b aus Kaninchenskelettmuskel

Dieses Enzym ist, u.a. weil es einfach und in großen Mengen hergestellt werden kann, eines der bestcharakterisierten Enzyme überhaupt. Deshalb wurde es in dieser Arbeit als Standard- bzw. Vergleichsenzym herangezogen. Zum andern wurde es während der Reinigung der Proteinphosphatase als Substrat benötigt.
In einer wie in 2.5.1. durchgeführten Präparation ließen sich aus 1 kg Muskelgewebe ca. 3 g Phosphorylase b gewinnen.
Die spezifische Aktivität der Präparation betrug in Richtung Glycogenabbau gemessen 30 und in Richtung Glycogensynthese gemessen ca. 89 units/mg Protein.
Die SDS-Gelelektrophorese wies nur eine Bande auf (Abb.19, S. 57).
Die Qualität der Präparation wurde außerdem durch den Grad des Phosphateinbaus (s. 2.6.) bestimmt, welcher typischerweise zwischen 0.92 und 0.99 mol P_i pro mol des monomeren Enzyms, d.h. zwischen 92 und 99 % des Maximalwertes (64) lag. Enzymaktivität und Phosphateinbaurate blieben innerhalb eines Jahres konstant.

3.2. Proteinphosphatase-1 aus Kaninchenskelettmuskel

1945 entdeckten Cori & Cori eine Enzymaktivität, die aktive GP a in inaktive GP b umwandelt (65), ohne sie allerdings als Proteinphosphatase zu identifizieren. Dieser Schritt gelang Wosilait & Sutherland 1955 (3). In den nächsten Jahren wurden parallel zur Entdeckung weiterer phosphorylierbarer Enzyme auch ständig "neue" Phosphatase-Aktivitäten gefunden. Die Eigenschaften und regulatorische Rolle der

Proteinphosphatasen blieben bis heute aus mehreren Gründen kontrovers (diskutiert in 66-68):

1. Da die intracelluläre Konzentration der PP sehr gering ist, erfordert ihre Reinigung mehrere hochauflösende und zeitaufwendige Schritte.
2. Sie kommen in multiplen Formen mit überlappenden Substratspezifitäten vor.
3. Sie sind relativ instabil.
4. Sie scheinen während der Reinigung und der Lagerung mehreren Modifikationen zu unterliegen.

Aufgrunddessen ist die Nomenklatur noch nicht vereinheitlicht. Im folgenden wird das 1983 von Cohen und Mitarbeitern vorgeschlagene Schema benutzt, das sämtliche PP-Aktivitäten nur vier Enzymen (1, 2A, 2B, 2C) zuordnete, die ihrerseits in zwei Gruppen (1 und 2) klassifiziert wurden, je nachdem ob das Enzym die ß- oder a-Untereinheit der Phosphorylasekinase dephosphoryliert (66). Die Phosphatasen vom Typ 1 werden außerdem von zwei hitzestabilen Inhibitorproteinen (Inhibitor-1 und -2) (27,49) und Mn^{2+} (68) gehemmt. Neben PP-1 besitzt nur noch PP-2A, wenn auch sehr viel niedrigere Phosphorylase-Phosphatase-Aktivität (66).

Bei einem systematischen Vergleich der Peptidsequenzen der Phosphatase-Substratproteine stellte sich heraus, daß in der Nachbarschaft der Phosphorylierungsstellen oftmals die basischen Aminosäuren Arg und Lys gehäuft vorkamen (zusammengefaßt in 66). Dies könnte die oft wenig ausgeprägte Substratspezifität der Proteinkinasen und Proteinphosphatasen erklären, gibt aber gleichzeitig Anlaß zur Frage nach deren Regulation. Während schon lange bekannt ist, daß die Proteinkinasen meist durch sog. second messengers (cAMP, cGMP, Ca^{2+}) spezifisch reguliert werden, ist heute, nach Studien vieler Phosphoenzyme, die Vorstellung allgemein akzeptiert, daß die Proteinphosphatasen eher durch "substratdirigierte Effekte" kontrolliert werden: So kann ein Metabolit oder Metallion ein bestimmtes Phosphoenzym zu einem "besseren" oder "schlechteren" Substrat der Phosphatase machen (33). Unter diesem Gesichtspunkt erschien eine exogene Proteinphosphatase als ideales Werkzeug, um die Eigenschaften verschiedener Phosphorylase-Moleküle vergleichend zu untersuchen.

Deshalb sollte eine Präparationsmethode für die Proteinphosphatase-1 entwickelt werden.

3.2.1. Enzympräparation

In der letzten Zeit publizierte Arbeiten (30,51,68-73) über die Reinigung der PP-1 wiesen sehr heterogene Ergebnisse auf, was sowohl die im Muskelextrakt gefundene Ausgangsaktivität als auch die Eigenschaften des Endprodukts betrifft. Die Ausgangsaktivitäten lagen zwischen 5.7 (72) und 111.8 units/g Muskel (69), die spezifischen Aktivitäten des Endprodukts lagen bei ca. 7800 (72), 22,600 (68) und 60,000 units/mg Protein (69). Zwei Gruppen, die von Cohen (69) und Fischer (72), kamen zu dem Schluß, daß die von ihnen gereinigten Enzyme mit einem M_r von 33,000 bzw. 38,000 mit gereinigtem Inhibitor-2 (M_r = 31,000) im Verhältnis von 1:1 zur sog. Mg-ATP-abhängigen Proteinphosphatase rekonstituiert werden kann. Die M_r=33,000-Form wurde demnach als katalytische Untereinheit der PP-1 betrachtet, die erst dann aktiv ist, wenn Inhibitor-2 phosphoryliert wird (32,69). Über die in vivo-Regulation des PP-1/Inhibitor-2-Komplexes ist zur Zeit noch nichts bekannt (74,75).

Ziel dieser Arbeit war es, diese in vitro aktive katalytische Untereinheit der Proteinphosphatase-1 bis zur Homogenität zu reinigen. Es wurde ein möglichst schnelles und schonendes Verfahren unter Ausnutzung der hochauflösenden FPLC-Technik angestrebt.

Extraktion: Die Ausgangsaktivität im Rohextrakt (hergestellt wie in 2.5.3. beschrieben) betrug im Mittel 88.5 ± 7.5 units/g Muskel (n = 8). Dabei spielte es keine Rolle, ob frisches oder in N_2 schnellgefrorenes Muskelgewebe verwendet wurde.
Ammonsulfatfällung: Auch der 2. Schritt (Fällung mit 35 % ges. Ammoniumsulfat) wurde bei acht Präparationen unverändert durchgeführt: Seine Ausbeute betrug 72.3 ± 3 %, seine Anreicherung 5.3 ± 0.6-fach. Während der ersten Präparationsschritte erwies sich das Enzym als extrem instabil. Verwendung mehrerer Proteaseinhibitoren in den Extraktionslösungen (1 mM PMSF, je 0.1 mM TLCK und TPCK) konnte diese

Tabelle 1: Reinigung der Proteinphosphatase-1 aus Kaninchenskelettmuskel

Fraktion	Protein mg	Aktivität units	Spezif. Aktivität units/mg	Ausbeute %	Anreicherung x-fach
Homogenat	32,400	7,504	0.23	(52)	1
6000g-Extrakt	9,324	14,000	1.50	100	6.5
35 % $(NH_4)_2SO_4$	1,300	10,270	7.90	73	34
DEAE-Sepharose Fast Flow	164	9,757	59.49	70	259
DEAE-Sephacel Konzentrat	77.3	7,500	97.05	54	422
Sephadex G-75 superfine	3.58	5,400	1509	39	6,560
Heparin-Sepharose CL-6B	0.73	4,698	6436	34	28,000

Ausgangsmaterial waren 180 g tiefgefrorenes Skelettmuskelgewebe. 1 unit ist definiert als Umsatz von 1 nmol Phosphat pro min unter den angegebenen Bedingungen (10.2 µM Phosphorylase a, 5 mM Theophyllin, pH 7.0, 30°C)

Instabilität jedoch nicht aufheben.

Im Anschluß an die Ammoniumsulfatfällung sollte das Enzym mittels Ionenaustauschchromatographie weitergereinigt werden. Wegen der Instabilität des Enzyms wurden nur schnelle Verfahren wie DEAE-Sephacel, DEAE-Sephadex A-50 (beide im Batch-Verfahren), das neue Gel DEAE-Sepharose Fast Flow sowie die FPLC-Säule Mono Q erprobt. Die beiden Batch-Verfahren ergaben im Anreicherungsgrad (beide etwa 3-fach), Mono Q in der Ausbeute (ca. 50 %) und dem Anreicherungsgrad (ca. 8-fach) unbefriedigende Ergebnisse. Beide Parameter fielen am besten nach Chromatographie an DEAE-Sepharose Fast Flow aus (95 % Ausbeute, 8-fache Anreicherung) (Abb. 2). In diesem Stadium war die Enzymaktivität gegenüber hohen Konzentrationen an NaCl sehr labil: Wenn die Säulen mit einem NaCl-Gradienten entwickelt wurden, fiel die Wiederfindung unter 10 %. Deshalb wurde die PP mit einem Tris-Gradienten von der Säule eluiert. Die Aktivität fand sich in einem singulären Peak. Im Anschluß an diesen Schritt blieb die Aktivität in Lösung bei 4 °C mindestens 3 Tage stabil.

Im Anschluß an die IEC wurden mehrere Abfolgen von Reinigungsschritten alternativ erprobt:

1. Affinitätschromatographie an Affigel-Blue (51) mit nachfolgender FPLC-Gelfiltration an Bio-Sil TSK 250. Nach diesen beiden Schritten wies das SDS-Gel nur eine Proteinbande (M_r = 38,000) auf, die spezifische Aktivität betrug 4350 units/mg Protein, die Gesamtausbeute jedoch nur noch 7.1 %. Dies war insbesondere auf den großen Aktivitätsverlust während der Affinitätschromatographie (50 %) zurückzuführen. Die TSK-Säule erwies sich zudem nur für Arbeiten mit geringen Proteinmengen als gut handhabbar.

2. Konventionelle Gelfiltration an Sephadex G-75 superfine und abschließend Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose CL-6B (37). Vor der Gelfiltration wurde das Eluat der Ionenaustauschsäule durch Bindung an DEAE-Sephacel so konzentriert, daß das Probevolumen ca. 2 % des Gelvolumens (v_t) betrug. Die PP-Aktivität wurde in zwei nicht vollständig voneinander getrennten Peaks eluiert (Abb. 3). Die Elutionsvolumina entsprachen den Molgewichten 60,000 und 38,000. Ein ähnliches Ergebnis (62,000 und 34,000) erzielte auch Cohens Arbeitsgruppe (51) an Sephadex G-100. Dieser Schritt allein ergab bei einer

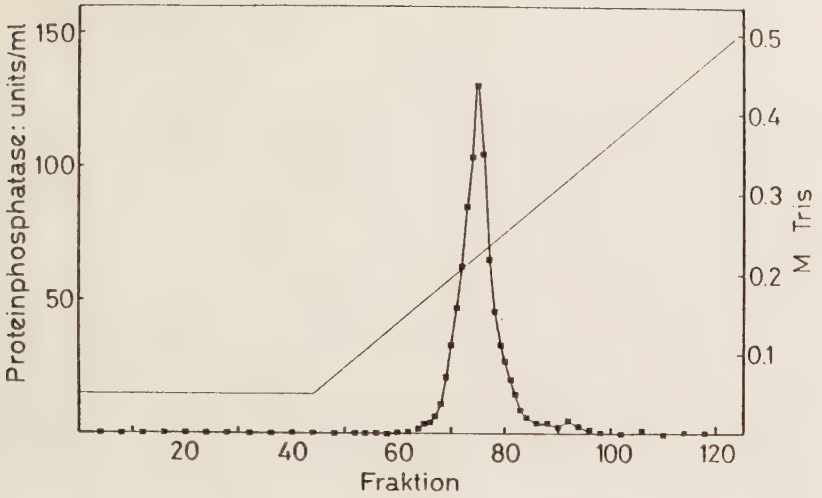
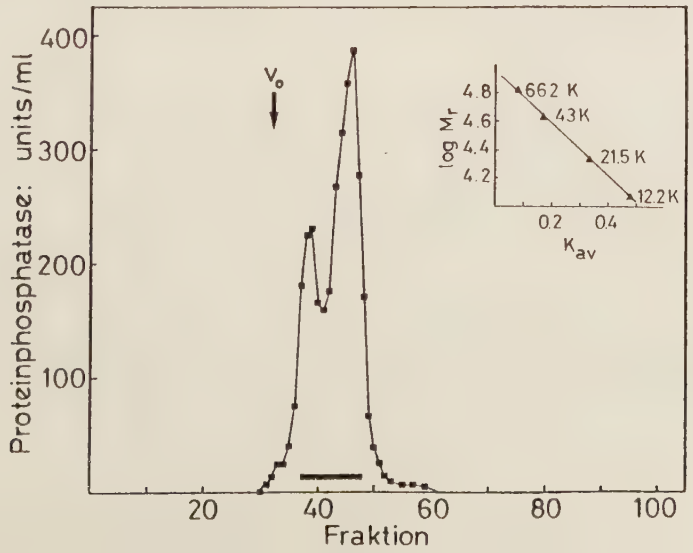


Abb. 2: Ionenaustauschchromatographie der Proteinphosphatase aus Kaninchenskelettmuskel an DEAE-Sepharose Fast Flow (3 x 26 cm, v_t = 184 ml), äquilibriert mit Puffer C. 10200 Units Proteinphosphatase wurden auf die Säule aufgetragen. Die Flußrate betrug konstant 120 ml/h. Adsorbierte Proteine wurden mit einem linearen Gradienten von 0.05 bis 0.5 M Tris/HCl, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Ethandiol (pH 7.5) eluiert. Fraktionen zu je 12 ml wurden gesammelt.

Abb. 3: Gelfiltration der Proteinphosphatase an Sephadex G-75 superfine (1.6 x 95 cm, v_t = 191 ml), äquilibriert mit Puffer C + 0.1 M NaCl. Probe: 7500 Units Proteinphosphatase. Die Flußrate betrug 7.6 ml/h, die Fraktionsgröße 1.9 ml. Die Säule wurde mit Proteinen bekannten Molekulargewichts geeicht: BSA (66.2 kD), Ovalbumin (43 kD), Trypsininhibitor (21.5 kD) und Cytochrom c (12.2 kD).



Ausbeute von 72 % eine mehr als 15-fache Anreicherung. Trotzdem war, wie die elektrophoretische Untersuchung zeigte, ein weiterer Reinigungsschritt notwendig, um annähernde Homogenität zu erzielen. Zunächst war versucht worden, das Enzym an immobilisierte Phosphorylase b (s. 2.4.3.) zu binden. Dies gelang jedoch nicht; die PP-Aktivität wurde zwar retardiert, aber mit dem Startpuffer (Puffer C) bei etwa 3 v_t eluiert. Die Inkubation einer geringen Menge der Gelsuspension mit Glycogen und P_i ergab, daß zumindest ein Teil der kovalent gebundenenen Phosphorylase aktiv war.

Deshalb wurde als letzter Reinigungsschritt die Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose CL-6B erprobt. Nach Gergely et al. (37) inhibiert Heparin Phosphatasen vom Typ 1, nicht jedoch die vom Typ 2. Der größte Teil der Aktivität wurde von der Säule gebunden und bei etwa 0.25 M NaCl in einem einzigen Peak eluiert (Abb. 4). 6 % der aufgetragenen Aktivität, die im Ausschlußvolumen der Säule eluiert wurden, repräsentierten wahrscheinlich eine Phosphatase vom Typ 2.

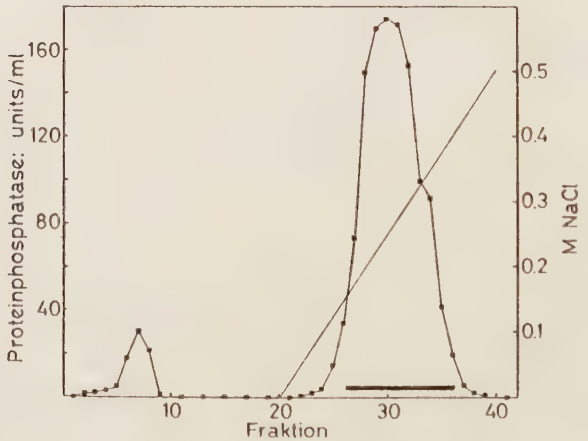


Abb. 4: Affinitätschromatographie der Proteinphosphatase an Heparin-Sepharose CL-6B (1.14 x 6 cm, v_t = 6 ml), äquilibriert mit Puffer C. Bei einer Flußrate von 20 ml/h wurden Fraktionen zu je 4 ml gesammelt. Die gebundene Proteinphosphatase wurde mit einem linearen Gradienten von 0 bis 0.5 M NaCl in Puffer C eluiert.

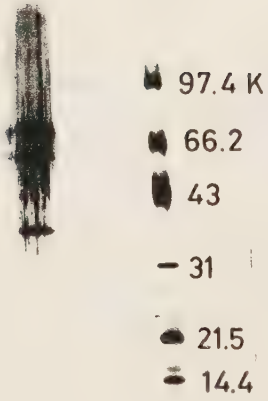
In Tabelle 1 ist ein typisches Reinigungsprotokoll wiedergegeben. Die spezifische Aktivität des Enzyms betrug 6400 units/mg Protein nach einer ca. 28,000-fachen Anreicherung.

3.2.2. Enzymeigenschaften

Reinheit und Molekulargewicht: Abb.5 zeigt die SDS-Gelelektrophorese der PP-Präparation. Die einzig zu erkennende Proteinbande entsprach dem Molekulargewicht 35,900. Ein ähnliches Molekulargewicht (38,000) zeigte das Enzym bei der analytischen Gelfiltration an Bio-Sil TSK 250 (Abb. 6). Die gereinigte Phosphatase besteht also wahrscheinlich aus einer einzigen Polypeptidkette.

Identifizierung der Phosphatase-Aktivität: Um sicherzustellen, daß das gereinigte Enzym eine Phosphatase ist und nicht eine Protease, die TCA-lösliche ^{32}P-markierte Peptide freigesetzt haben könnte, wurde das Endprodukt nach der modifizierten Methode analysiert, in der P_i mit Molybdat komplexiert und mit organischen Lösungsmitteln extrahiert wird (s. 2.8.5.). Dies zeigte, daß mehr als 97 % der von diesem Enzym freigesetzten ^{32}P-Radioaktivität in der Tat anorganisches Phosphat waren.

Da kein Proteininhibitor der Phosphatase-1 zur Verfügung stand, der eine sichere Diskriminierung zwischen PP-1 und -2 erlaubt hätte, wurden andere enzymatische Eigenschaften untersucht, um durch Vergleich mit bekannten Daten aus der Literatur das isolierte Protein zu identifizieren.
Da die Affinitätschromatographie eine Interaktion zwischen Heparin und der Proteinphosphatase demonstriert hatte, wurde der Einfluß dieser Substanz auf die Aktivität der PP untersucht. Abb. 7 zeigt, daß Heparin in einer Konzentration von 250 ug/ml die PP-Aktivität zu etwa 95 % inhibiert. Im Verlauf dieser Studie erschien ein Bericht von Pelech und Cohen (52) mit ähnlichen Ergebnissen: Heparin (150 ug/ml) hemmt die PP-1 zu > 90 %, nicht jedoch die PP-2A. Nach diesen Autoren kann demzufolge Heparin wie Inhibitor-1 oder -2 dazu benutzt werden, die PP-1 von der PP-2A zu unterscheiden.



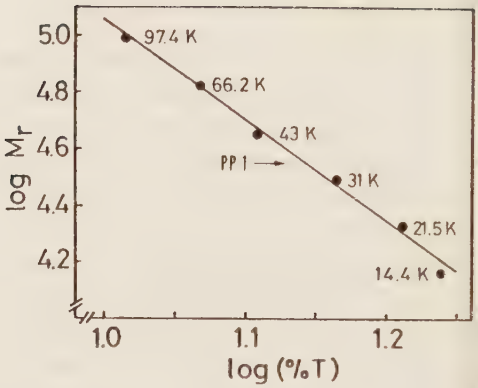
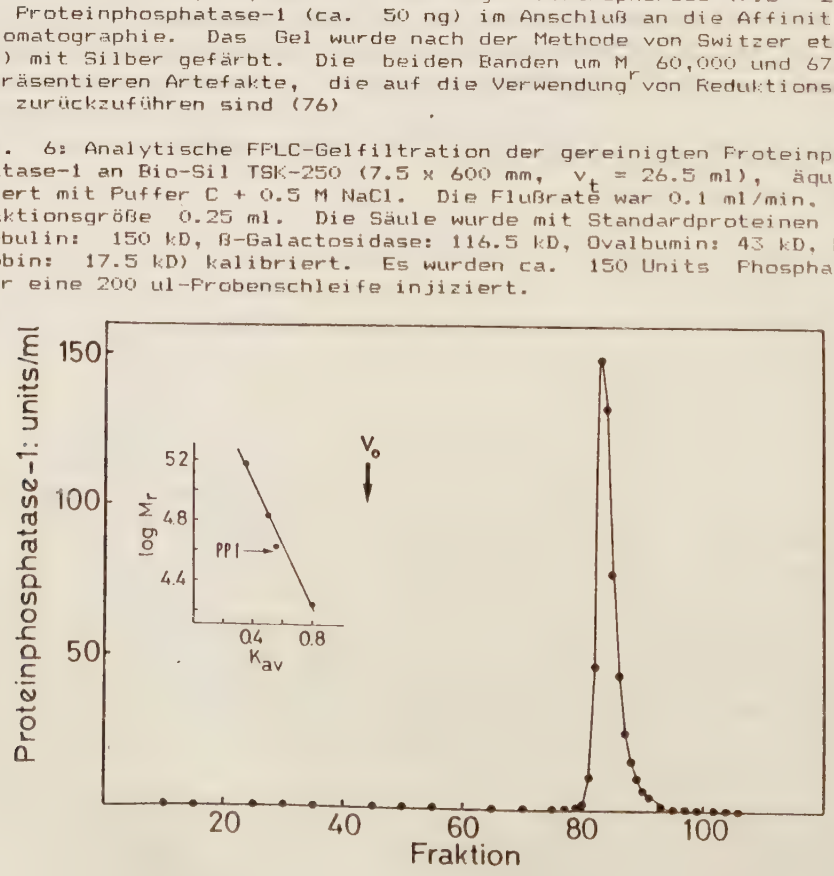


Abb. 5: SDS-Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese (7.5 - 20 %) der Proteinphosphatase-1 (ca. 50 ng) im Anschluß an die Affinitätschromatographie. Das Gel wurde nach der Methode von Switzer et al. (54) mit Silber gefärbt. Die beiden Banden um M_r 60,000 und 67,000 repräsentieren Artefakte, die auf die Verwendung von Reduktionsmittel zurückzuführen sind (76)

Abb. 6: Analytische FPLC-Gelfiltration der gereinigten Proteinphosphatase-1 an Bio-Sil TSK-250 (7.5 x 600 mm, v_t = 26.5 ml), äquilibriert mit Puffer C + 0.5 M NaCl. Die Flußrate war 0.1 ml/min, die Fraktionsgröße 0.25 ml. Die Säule wurde mit Standardproteinen (γ-Globulin: 150 kD, ß-Galactosidase: 116.5 kD, Ovalbumin: 43 kD, Myoglobin: 17.5 kD) kalibriert. Es wurden ca. 150 Units Phosphatase über eine 200 ul-Probenschleife injiziert.



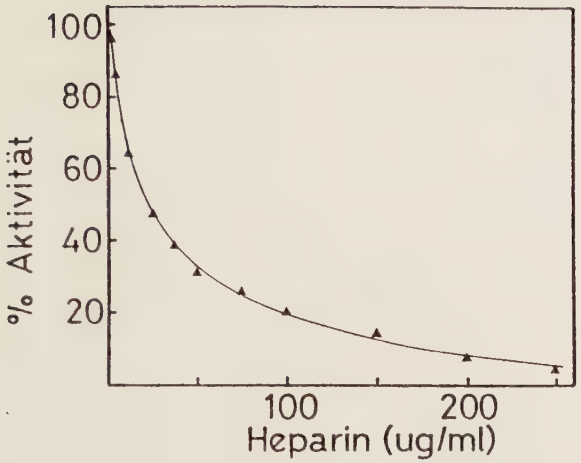
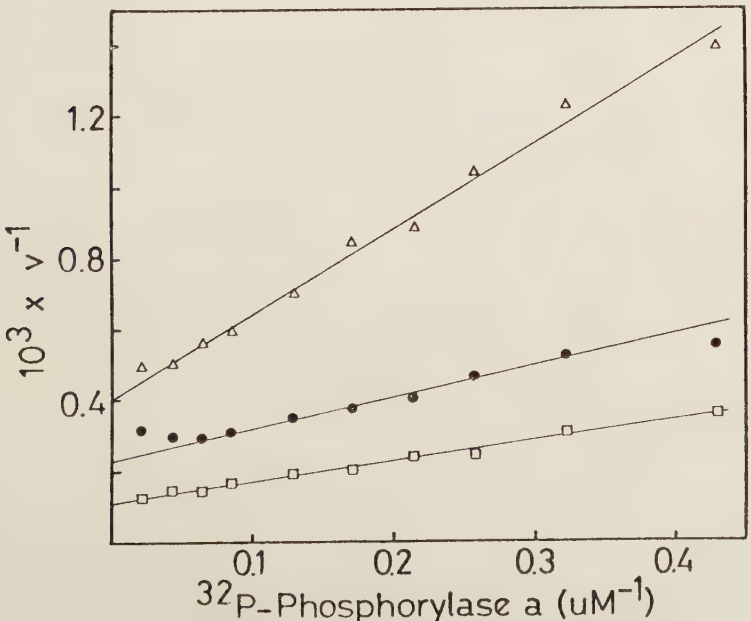


Abb. 7: Einfluß von Heparin auf die Aktivität der gereinigten Proteinphosphatase-1. Der Reaktionsansatz (60 ul) enthielt neben den üblichen Komponenten (s. 2.8.5.) Heparin zwischen 2.5 und 250 ug/ml sowie 10.2 uM ^{32}P-Phosphorylase a.

Abb. 8: Reaktionsgeschwindigkeit der Phosphatase-Reaktion in Abhängigkeit von der Phosphorylasekonzentration in der doppelt reziproken Auftragung. (●) Kein Effektor, (△) 2 mM $MnCl_2$, (□) 5 mM Theophyllin.



Der apparente K_M-Wert für das natürliche Substrat, Phosphorylase a aus Kaninchenmuskel, lag bei 3.9 uM (Monomer), V_{max} betrug ca. 4400 units/mg Protein. In Gegenwart von 5 mM Theophyllin betrug V_{max} ca. 9000 units/mg, der K_M 5.1 uM. Manganionen senkten sowohl die Affinität zum Substrat (K_M = 5.9 uM) als auch V_{max} (ca. 2500 units/mg Protein) (Abb. 8). Im Verlauf dieser Arbeit beschrieben Lee et al. (68) eine Kaninchenmuskel-Phosphatase, genannt C-I (M_r = 35,000), die ebenfalls durch Manganionen und zudem durch Inhibitor-1 und -2 gehemmt wird und spezifisch die ß-Untereinheit der Phosphorylasekinase dephosphoryliert. Eine gleichzeitig gereinigte "Proteinphosphatase C-II" wurde dagegen von Mn^{2+} aktiviert, war spezifisch für a-GPK und wurde nicht von den beiden Proteininhibitoren gehemmt. In einer weiteren Studie konnten Speth und Lee (77) demonstrieren, daß in vitro Insulin (2.5 uM) die PP C-II etwa vierfach stimuliert, auf die Aktivität der PP C-I dagegen keinen Einfluß hat. Die hier beschriebene Proteinphosphatase konnte durch 3 uM Insulin nicht aktiviert werden (Tab. 2).

Die eigenen Ergebnisse im Vergleich mit der Literatur legen den Schluß nahe, daß die von Lee C-I genannte Phosphatase und das in dieser Arbeit beschriebene Enzym mit der Proteinphosphatase-1 nach Cohen (66) identisch sind oder zumindest identische Vorläufer haben.

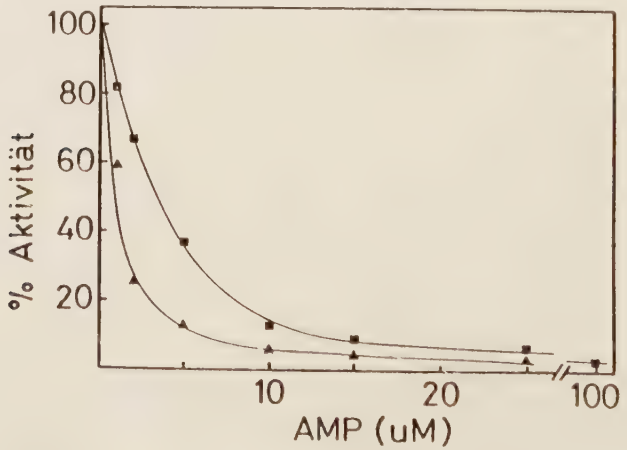


Abb. 9: Verstärkte Hemmung der Phosphorylase-Dephosphorylierung durch AMP infolge Präinkubation mit dem Substratprotein: (■) AMP wurde mit Proteinphosphatase-1 5 min präinkubiert, die Reaktion mit ^{32}P-Phosphorylase a gestartet. (▲) AMP wurde mit ^{32}P-Phosphorylase präinkubiert, die Reaktion mit Proteinphosphatase-1 gestartet. Die Phosphorylasekonzentration betrug in beiden Fällen 10.2 uM.

Tabelle 2: Einfluß verschiedener Effektoren auf die Phosphorylase-Dephosphorylierung durch Proteinphosphatase-1

Addition	Konzentration (mM)	Aktivität in % der Kontrolle nach Vorinkubation des Effektors mit Proteinphosphatase-1	Phosphorylase
Mg(II)	2	66	68
Ca(II)	2	64	64
Mn(II)	2	53	56
Phosphat	0.5	75	89
Fluorid	20	16	75
Fluorid	100	2	9
EDTA	1	77	90
EGTA	1	84	89
Glucose	1	137	140
Glucose	4	171	170
Glucose	20	216	225
Theophyllin	5	199	208
ATP	0.5	25	22
ADP	0.5	4	3
Insulin	0.0003	100	

Experimentelle Bedingungen siehe Abb. 9 (S.38) und 2.8.5. (S.18).

Um die Phosphatase und die Wechselwirkung mit ihrem Substrat, der Phosphorylase, eingehender zu charakterisieren, wurde der Einfluß verschiedener Substanzen auf die Dephosphorylierungsrate der GP untersucht (Tab. 2). Durch AMP wurde das Enzym in konzentrationsabhängiger Weise gehemmt. Wurde anstelle der PP-1 das Substratprotein mit AMP vorinkubiert, so verstärkte sich die hemmende Wirkung (Abb.9). In Übereinstimmung mit anderen Autoren (78-80) liegt der Schluß nahe, daß diese Inhibition durch eine Bindung des AMP an die GP zustande kommt. Nach dem gleichen Prinzip üben die anderen Nucleotide ATP und ADP ihren hemmenden und Glucose sowie Coffein oder Theophyllin ihren aktivierenden Einfluß aus; deren Konzentrationen lagen jedoch soweit über dem K_i bzw. K_a, daß nach 10 min Inkubationszeit nur noch ein Gleichgewichtszustand erfaßt wurde (81,82). Diese Effektoren binden an allosterische Zentren der GP und erhöhen oder erniedrigen über eine Konformationsänderung die Zugänglichkeit der phosphorylierten Aminosäure für die PP: ein Beispiel für die schon erwähnten substratdirigierten Effekte (33). Nicht nur die PP, sondern auch das Phosphoproteinsubstrat kann seine eigene Dephosphorylierung regulieren. Nur Fluoridionen wirken direkt auf die PP, da ihre inhibitorische Wirkung sich erheblich verstärkte, wenn sie mit der Phosphatase statt Phosphorylase vorinkubiert wurden (Tab. 2).

3.3. Präparation der Phosphorylasen Ib und IIb aus Rattenherz

3.3.1. Normaltiere

Tabelle 3 gibt das Reinigungsprotokoll mit den Mittelwerten ± SEM wieder. Wie die Mittelwerte sowie Standardabweichungen zeigen, lieferte die Methode reproduzierbare Ergebnisse. Der Zeitbedarf für die Präparation liegt, falls beide Affinitätssäulen gleichzeitig betrieben werden, bei 3 Tagen.

Die spezifische Aktivität beider Enzymformen nach der Affinitätschromatographie lag im Bereich zwischen 40.4 und 50.4 units/mg Protein mit Mittelwerten von 47.8 (GP-I) bzw. 46.3 units/mg. Die Aktivitäten waren im Gegensatz zur Kaninchenskelettmuskel-GP in beiden Reaktionsrichtungen nahezu identisch (vgl. 3.1.). Eine höhere spezifische Aktivität ließ sich weder durch Gelfiltration (s. S. 59) noch durch Rechromatographie an einem Anionenaustauschergel erreichen. Die Gesamtausbeute (Summe der Aktivitäten von GP-I und -II) lag zwischen 45 und 56 % und betrug im Mittel 50.7 ± 2.1 %.

Mittels Ionenaustauschchromatographie wurden zwei Enzymformen isoliert. Sie wurden bei 0.06 bzw. 0.13 M NaCl eluiert (Abb. 10). Die Zerlegung des Gradienten in mehrere lineare Abschnitte wurde vorgenommen, um die sonst unzureichende Auflösung zwischen den beiden Peaks zu verbessern und um Peak II zu schärfen. Wie früher gezeigt, waren beide Peaks nur in Gegenwart von 1 mM AMP aktiv, unterschieden sich aber in ihrer Hemmbarkeit durch 5 mM Coffein: In Gegenwart dieses Inhibitors verblieben von Peak I noch 1o, von Peak II 50 % Restaktivität (7).

Der Quotient II/I+II betrug nach der IEC 0.2 und nach der AC 0.22. Nimmt man an, daß dieses Verhältnis dem intracellulären gleich ist, so ergibt sich für GP-II im Rohhomogenat eine Aktivität von 0.026 units/mg (GP-I: 0.104 units/mg) und eine knapp 1800-fache Anreicherung nach der Affinitätschromatographie (GP-I: ca. 460-fach).

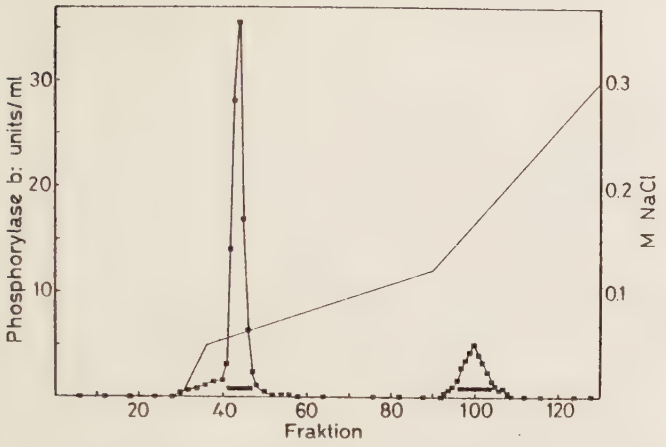


Abb. 10: Typisches Elutionsprofil der Rattenherzphosphorylasen bei Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose Fast Flow (3 x 22 cm, v_t = 155 ml), äquilibriert mit Puffer A. Es wurden 1237 Units Phosphorylase aufgetragen. Die Flußrate betrug 106.8 ml/h, die Fraktionsgröße 8.9 ml. Phosphorylase I und II wurde mit Hilfe eines angepaßten, maschinell geformten Gradienten von 0 - 0.3 M NaCl in Puffer A eluiert. Die Aktivität beider Peaks konnte nur in Gegenwart von 1 mM AMP nachgewiesen werden. Die Wiederfindung betrug 947 Units (Peak I) + 228 Units (Peak II) entsprechend 95 % der aufgetragenen Aktivität.

Abb. 11: Typisches Elutionsprofil der Phosphorylasen I (■) und II (○) bei Affinitätschromatographie an AMP-Sepharose 4B (1.14 x 8.2 cm, v_t = 8.4 ml), äquilibriert mit Puffer A. Die Flußrate betrug 28.8 ml/h. Die Pfeile bezeichnen den Einsatz verschiedener Eluenten. Weder im Durchlauf noch in der Salzstufe ließ sich Aktivität nachweisen. Nach Reäquilibrierung mit Puffer A wurden beide Isoenzyme mit 10 mM AMP eluiert. Die Fraktionsgröße war 4 ml. Von 900 Units GP-I wurden 755 (84 %), von 218 Units GP-II wurden 195 Units (89 %) wiedergefunden.

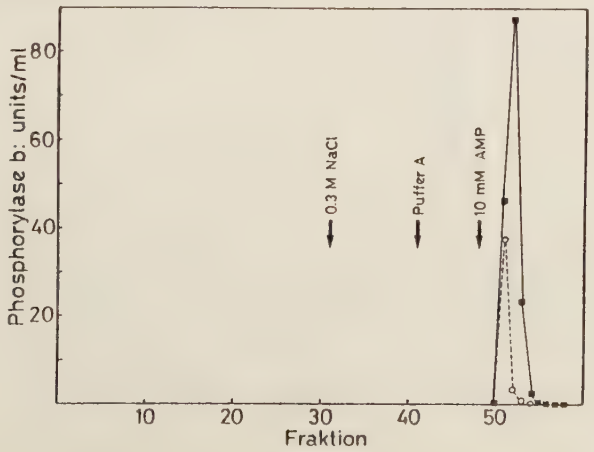


Tabelle 3: Reinigung der Glycogenphosphorylasen I und II aus Rattenherzen

Fraktion	Protein mg	Aktivität units	Spezifische Aktivität units/mg	Ausbeute %	Anreicherung x-fach
Homogenat	15421 ±634	2009±101	0.13±0.007	100 ±0.0	1 ± 0.0
Vereinigte Extrakte	5806 ±282	1861± 95	0.33±0.017	92.3±1.3	2.5± 0.13
50 % $(NH_4)_2SO_4$	1587 ± 94	1433± 66	0.93±0.072	71.5±3.1	7.2± 0.57
DEAE-Sepharose Fast Flow Peak I	150.2 ± 22.7	944± 57	7.17±0.85	47.0±2.7	57.2± 9.5
DEAE-Sepharose Fast Flow Peak II	205 ± 24.2	238± 15	1.28±0.183	11.9±0.7	10.1± 1.55
AMP-Sepharose 4B Peak I	16.9 ± 0.77	807± 39	47.8 ±0.71	40.1±1.5	375 ±19
AMP-Sepharose 4B[1] Peak II	4.97± 0.27	231± 19	46.3 ±2.04	10.6±0.6	341 ±21

Sämtliche Daten wurden auf 100 g Ausgangsmaterial hochgerechnet. Angegeben sind die Mittelwerte aus 8 Präparationen ([1] n=4) ± SEM. 1 unit ist definiert als Umsatz von 1 µmol Substrat unter den angegebenen Bedingungen (50 mM P_i, 13 mM Glycogen, 1 mM AMP, pH 6.8, 30°C)

Reinheit:

Die Präparation wurde auf enzymatische Kontaminationen wie Glycogensynthase, Phosphorylasekinase, cAMP-abhängige Proteinkinase und Proteinphosphatase hin untersucht: Keine dieser Enzymaktivitäten war nachweisbar.

In der nativen Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese wiesen beide Enzymformen nur jeweils eine Proteinbande auf, deren Wanderungsstrecke derjenigen der Aktivitätsbande entsprach (Abb. 12).

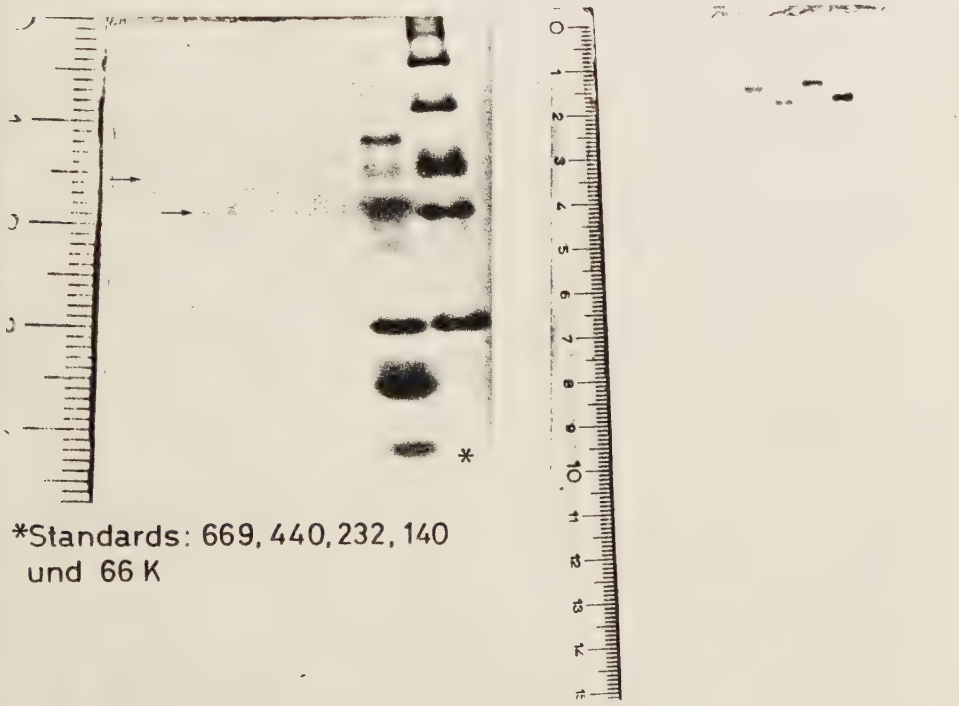


Abb. 12: Native Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese (5 - 30 %) der Phosphorylase-Präparationen. Links: Coomassie Blue R-gefärbtes Gel, rechts: nativ gefärbtes Gel. Von links nach rechts: N-I, N-II, D-I, D-II

Tabelle 4: Reinigung der Glycogenphosphorylasen I und II aus diabetischen Rattenherzen

Fraktion	Protein mg	Aktivität units	Spezifische Aktivität units/mg	Ausbeute %	Anreicherung x-fach
Homogenat	10187 ±1131[2]	1560±157	0.15±0.003[1]	100 ±0.0	1 ± 0.0
Vereinigte Extrakte	3095 ± 472[2]	1492±144	0.50±0.046[1]	96.0±0.7	3.3± 0.29
50 % $(NH_4)_2SO_4$	880 ± 126[3]	1093±153	1.25±0.043[3]	69.3±4.3	8.2± 0.35
DEAE-Sepharose Fast Flow Peak I	83.5 ± 20.5	567±114[1]	7.03±0.35	35.4±4.6	46.0± 1.7
DEAE-Sepharose Fast Flow Peak II	126.1 ± 18.7[1]	156± 28[1]	1.17±0.19	9.6±0.9	8.2± 1.4
AMP-Sepharose 4B Peak I	8.25± 3.49	385± 74[3]	45.6 ±2.98	24.3±3.1[2]	299 ±24[1]
AMP-Sepharose 4B Peak II	2.17± 0.37[3]	90± 17[3]	41.4 ±0.95	5.7±0.6[3]	275 ± 7.8[1]

Sämtliche Daten wurden auf 100 g Ausgangsmaterial hochgerechnet. Angegeben sind die Mittelwerte aus 4 Präparationen ± SEM. 1 unit ist definiert als Umsatz von 1 µmol Substrat pro min unter den angegebenen Bedingungen (50 mM P_i, 13 mM Glycogen, 1 mM AMP, pH 6.8, 30°C).

[1] $p < 0.05$ versus Kontrolle (vgl. Tabelle 3)
[2] $p < 0.01$ " "
[3] $p < 0.005$ " "

3.3.2. Akut diabetische Tiere

Um fragliche diabetesinduzierte Veränderungen der Phosphorylase untersuchen zu können, wurde das Enzym aus diabetischen Herzen nach demselben Verfahren gereinigt. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse aus insgesamt vier Präparationen wiedergegeben.
Die spezifische Aktivität der Endprodukte lag in derselben Größenordnung wie bei den Kontrollen. Der Gesamtprotein- sowie Phosphorylasegehalt war dagegen vermindert. Da die Proteinmenge jedoch deutlicher erniedrigt war als die Gesamtaktivität, war die spezifische Aktivität während der ersten Schritte der Präparation gegenüber den Kontrollherzen erhöht. Dem entsprach nach Abschluß der Präparation der geringere Anreicherungsfaktor. Der wichtigste Unterschied zum gesunden Herzen war, daß die Ausbeute beider GP-Formen im Vergleich zu den Kontrollen um nahezu 50 % erniedrigt war. Die Aktivitätsverluste ergaben sich erst während der chromatographischen Schritte.

Die Ionenstärken, bei denen GP-I und GP-II von der DEAE-Sepharose-Säule eluiert wurden, waren identisch mit denen der Normalenzyme.
Das Verhältnis von GP-II zur Gesamtaktivität war ebenfalls unverändert: Nach der IEC betrug es 0.22.
Für die Reinheit der diabetischen Phosphorylasen gilt dasselbe wie für die aus normalen Herzen isolierten Enzyme (vgl. Abb. 12).

3.4. Identifikation der cardialen Phosphorylase-Aktivitäten

Herzspezifische Isoenzyme der GP sind bei verschiedenen Säugern nachgewiesen worden (5,6,83-85). Partiell gereinigte Herzextrakte aus Kaninchen, Schwein, Schaf und Mensch zeigten elektrophoretisch 3 GP-Aktivitätsbanden, während Rattenherzextrakte nur eine Bande aufwiesen (83). In Übereinstimmung mit diesem Befund konnten Vereb et al. (84) zeigen, daß Antikörper gegen Kaninchenmuskel-GP eine vollständige Hemmung der Rattenherz-GP bewirken, was nicht auf ein spezifisches Herzenzym hindeutet. Im Gegensatz hierzu konnten Sato et al. (85) diskelektrophoretisch zwei GP-Formen in Rattenherzextrakten nachweisen.

Wegen dieser widersprüchlichen Befunde wurden einige Experimente durchgeführt, um zu klären, ob das Auftreten zweier GP-Formen einen präparationsbedingten Artefakt darstellt oder ob es sich vielmehr um zwei native Proteine handelt.

3.4.1. Präparation der Phosphorylase b aus Rattenskelettmuskel

Als erstes wurde das in Kapitel 2.5.2. beschriebene Reinigungsverfahren unverändert auf Skelettmuskel (10 g) angewandt. Im Anschluß an die Extraktion und die Ammoniumsulfatfällung wurde das Enzym an eine DEAE-Sepharose Fast Flow-Säule (2 x 14 cm) gebunden. Der Gradient, mit dem die Säule dann entwickelt wurde, war in Relation zu den Säulenmaßen in Form und Volumen identisch mit dem in Kap. 2.5.2. beschriebenen.

Die GP-Aktivität wurde in einem singulären Peak bei ca. 0.06 M NaCl eluiert und entsprach damit dem Peak I-Enzym aus Herz. Größere Ionenstärken (0.5 und 1.0 M NaCl) waren hier ebensowenig wie bei der Präparation der cardialen GP in der Lage, weitere Enzymaktivität von der Gelmatrix zu desorbieren.
Dieses Experiment legt den Schluß nahe, daß die Elution zweier GP-Formen ein herzspezifisches Phänomen darstellt.

Die spezifische Aktivität der Rattenmuskel-GP erreichte entsprechend der fünfmal größeren Ausgangsaktivität schon nach ca. 120-facher Anreicherung dasselbe Niveau wie die beiden cardialen Enzyme (vgl. Spalte 1 der Tab. 3, 4 und 5). Da auch im SDS-Gel nichts auf wesentliche Verunreinigungen hindeutete (Abb.19, S.57), wurde auf weitere Reinigungsschritte verzichtet.

3.4.2. Immunologische Eigenschaften der Phosphorylasen I und II

Um die eingangs gestellte Frage (s.o.) zu beantworten, wurde ein immunologischer Testansatz benutzt, der möglicherweise zur Aufklärung bestehender Verwandtschaften zwischen den Isoenzymformen der GP beitragen konnte.

Tabelle 5: Reinigung der Glycogenphosphorylase aus Rattenskelettmuskel

Fraktion	Protein mg	Aktivität units	Spezif. Aktivität units/mg	Ausbeute %	Anreicherung x-fach
Homogenat	25,560	10,690	0.418	100	1
8000g-Extrakt	5,240	9,480	1.81	88	4
50 % $(NH_4)_2SO_4$	982	7,850	8.0	73	19
DEAE-Sepharose Fast Flow	128	6,610	51.6	62	124

Ausgangsmaterial waren 24 g Rattenskelettmuskel, die Daten wurden jedoch der besseren Vergleichbarkeit wegen auf 100 g Ausgangsmaterial hochgerecnnet. 1 unit ist definiert als Umsatz von 1 µmol Substrat pro min unter den angegebenen Bedingungen (50 mM P_i, 13 mM Glycogen, 1 mM AMP, pH 6.8, 30°C).

Zu diesem Zweck wurden je einem Kaninchen, einem Schaf und einer Ziege Rattenskelettmuskel-GP injiziert (s. 2.1.). Antiseren wurden 3 Wochen nach einer ersten Booster-Injektion entnommen. Diese wurden dann auf ihre aktivitätshemmende und präzipitierende Wirkung hin untersucht.

A) Aktivitätshemmung:

Eine eindeutige Immunantwort ließ sich nur im Schafserum nachweisen. Während Ziegenserum nur unverdünnt einen geringfügig hemmenden Effekt zeigte und Kaninchenserum total ineffektiv war, ließ sich die GP-Aktivität durch eine 10-fache Verdünnung des Schafserums total und durch eine 10000-fache Verdünnung noch bis zu 50 % unterdrücken (Abb. 13).

Wurde Schaf-Antiserum in gleicher Weise mit Herz-GP-I und GP-II inkubiert, wurde nur GP-I in ähnlicher Weise wie das Skelettmuskelenzym gehemmt. GP-II blieb unverändert aktiv (Abb. 13).

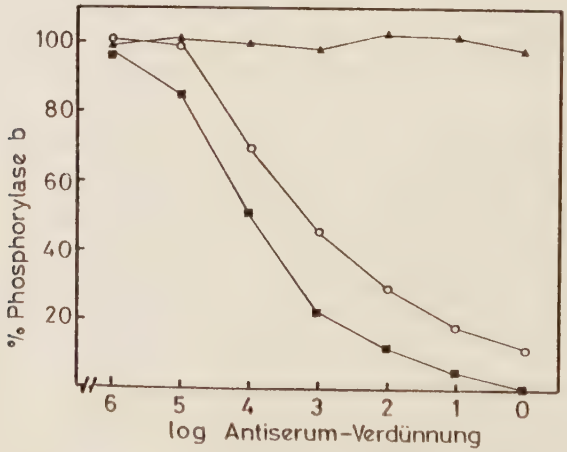


Abb. 13: Hemmung der Phosphorylase-Aktivität durch Schaf-Antiserum gegen Rattenskelettmuskelphosphorylase. Experimentelle Bedingungen siehe Methodenteil (2.10.). 100 % = 40 Units/ml. (■) Rattenskelettmuskelphosphorylase, (○) Rattenherzphosphorylase I, (▲) Rattenherzphosphorylase II

B) Immunpräzipitate:

Dieses Ergebnis wurde durch die Immunelektrophorese sowie die radiale Immundiffusion erhärtet: SM-GP und GP-I zeigten nahezu identische Banden; mit GP-II dagegen war keine Präzipitation zu beobachten (Abb. 14).

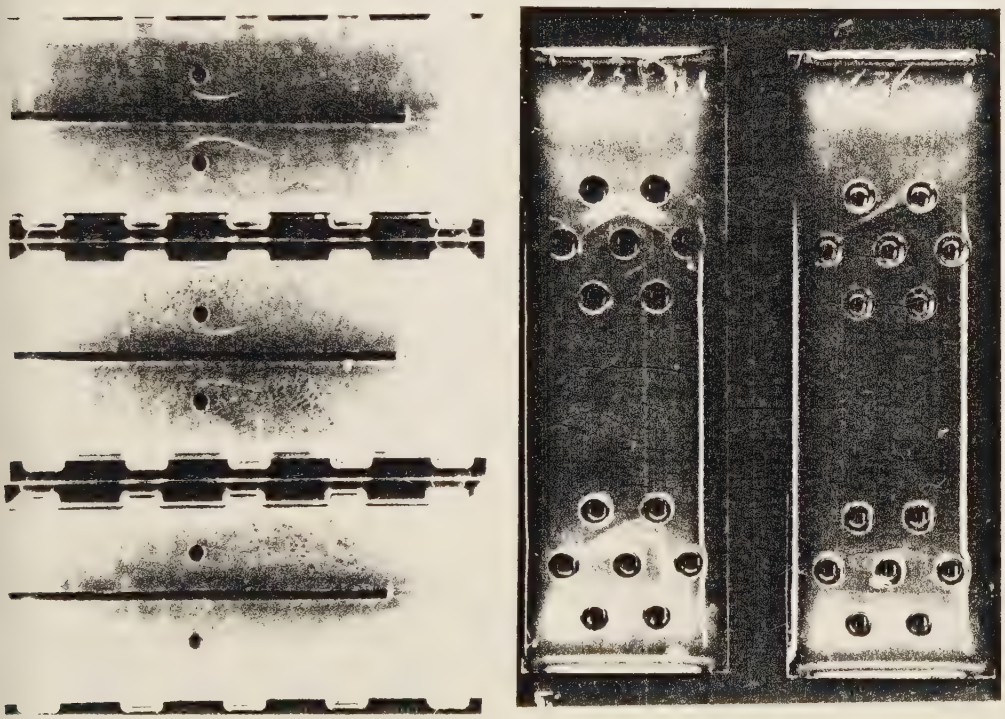


Abb. 14: Immunpräzipitate der Phosphorylase-b-Isoenzyme mit Schaf-Antiserum gegen Rattenskelettmuskelphosphorylase.
A. Immunelektrophorese: Die Tröge wurden mit Antiserum, die ausgestanzten Löcher eines Trägers von oben nach unten jeweils mit RSM-GP, H-GP-I und H-GP-II beladen.
B. Radiale Immundiffusion: Die Beladung der ausgestanzten Löcher war wie folgt: Links oben: Zentrum: Antiserum, 1 und 2: RSM-GP, 3 und 4: H-GP-I, 5 und 6: H-GP-II. Links unten: Zentrum: RSM-GP, 1 bis 6: Verdünnungsreihe des Antiserums (1, 10, 50, 250, 1000, 5000, 25000). Rechts oben: Zentrum: H-GP-I, 1 bis 6: wie links unten. Rechts unten Zentrum: H-GP-II, 1 bis 6: wie links unten.

3.4.3. Phosphorylase-Isoenzyme im Herzmuskelextrakt

Als letztes Experiment zur Identifikation der beiden isolierten GP-Formen wurde ein Herzmuskelextrakt gemäß 2.5.2. hergestellt und elektrofokussiert (s. 2.9.3.).
Abb. 15 zeigt die nativ gefärbten Aktivitätsbanden. Demnach sind in einem Herzmuskelextrakt vier deutliche GP-Banden nachweisbar, die sich in ihrem I.P. unterscheiden: 5.5, 5.7., 5.9, und 6.25. Dabei ist zu bedenken, daß in einem Rohextrakt gewöhnlich phosphorylierte, dephosphorylierte sowie auch partiell phosphorylierte Formen eines Enzyms nebeneinander vorliegen. Es lag also nahe anzunehmen, daß es sich bei den vier Banden um die Isoformen Ia, Ib, IIa und IIb handelte. Die Identifikation der vier Banden wird in einem der folgenden Kapitel (3.6.2.) beschrieben.

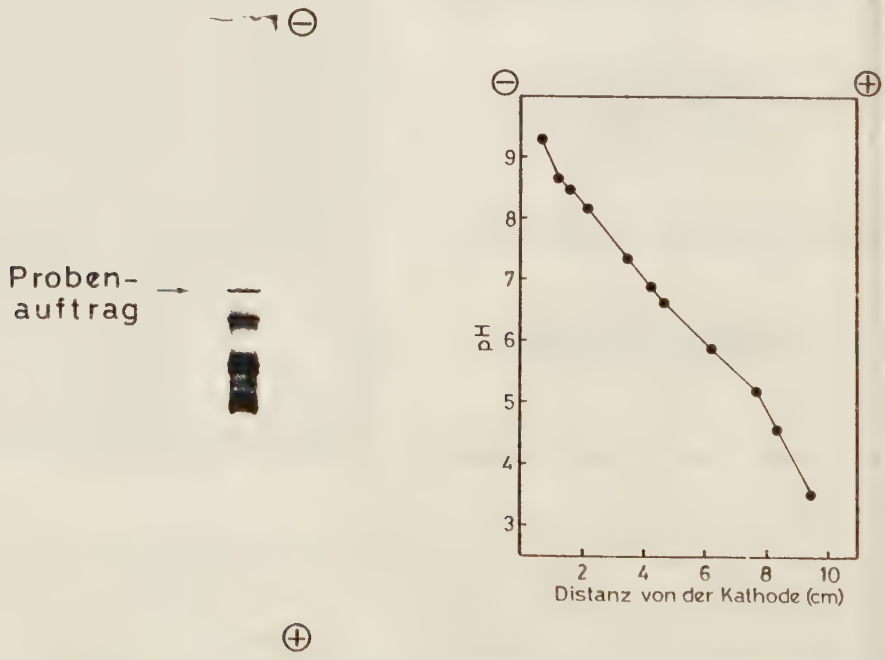


Abb. 15: Isoelektrische Fokussierung eines Rattenherzmuskelextraktes im pH-Gradienten (3.5 bis 9.5). Die Eichung erfolgte mit Standard-proteinen von Pharmacia. Spezifische Anfärbung der Phosphorylase-Aktivität

Die Ergebnisse der zuletzt beschriebenen drei Experimente zusammenfassend läßt sich sagen:

a) Es gibt nur eine Skelettmuskel-Phosphorylase.
b) Im Gegensatz zu GP-I reagiert GP-II nicht mit Anti-Skelettmuskel-Phosphorylase.
c) Im frischen Herzmuskelextrakt lassen sich elektrophoretisch vier Isoformen der Phosphorylase mit unterschiedlichem I.P. nachweisen.

Damit ließ sich der Verdacht, daß es sich bei GP-II um einen Artefakt handeln könnte, ausschließen. Erst jetzt erschien es sinnvoll, weitere Unterschiede zwischen GP-I und GP-II einerseits sowie zwischen den normalen und diabetischen Enzymen auf physikochemischer und physiologischer Ebene zu untersuchen.

3.5. Physikochemische Eigenschaften der Phosphorylase-Isoenzyme

Um die beiden cardialen Isoenzyme zu charakterisieren bzw. voneinander abzugrenzen, wurden einige physikochemische Eigenschaften (Einfluß des pH-Wertes und der Temperatur auf die Aktivität, Molekulargewicht und Quartärstruktur) untersucht.

3.5.1. Effekt des pH-Wertes auf die Phosphorylase-Aktivität

Bei der Untersuchung der Temperatur- und pH-Abhängigkeit der GP-Aktivität wurde zunächst nur der gekoppelte optische Test (2.8.1.) (bei den pH-Messungen ausschließlich) benutzt, weil 1. nur hier aus methodisch-technischen Gründen der pH-Wert kontrolliert werden konnte und 2. die Linearität der Anfangsgeschwindigkeit beobachtet werden sollte. Diese war in jedem Falle über einen Zeitraum von 1 min gegeben. Die Aktivität der Hilfsenzyme bei den extremen pH-Werten und Temperatu-ren wurde vorher überprüft. Damit diese nicht limitierend wirkte, wurde ggf. die zugegebene Menge entsprechend erhöht.
Die pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität und -stabilität ist in Abb.16 dargestellt. Für die einzelnen pH-Bereiche wurden die in der Abb. angegebenen Puffer in o.1 M Konzentration eingesetzt. Für die Stabilitätsuntersuchung wurde das Enzym jeweils 10 min bei verschiedenen

pH-Werten vorinkubiert. Anschließend wurde bei optimalem pH (6.8) die Aktivität gemessen.

GP-I ist zwischen pH 5.25 und 8.5, GP-II zwischen pH 4.75 und 8.75 stabil. Dem entsprach der breiter scheinende pH-Optimalbereich der GP-II. Erst jenseits dieser pH-Werte trat irreversible Inaktivierung ein. Der Abfall der Aktivität zwischen dem pH-Optimum und den beidseitigen Stabilitätsgrenzen ist also lediglich auf die Bildung "ungeeigneter" ionischer Gruppen (im aktiven Zentrum ?) zurückzuführen.

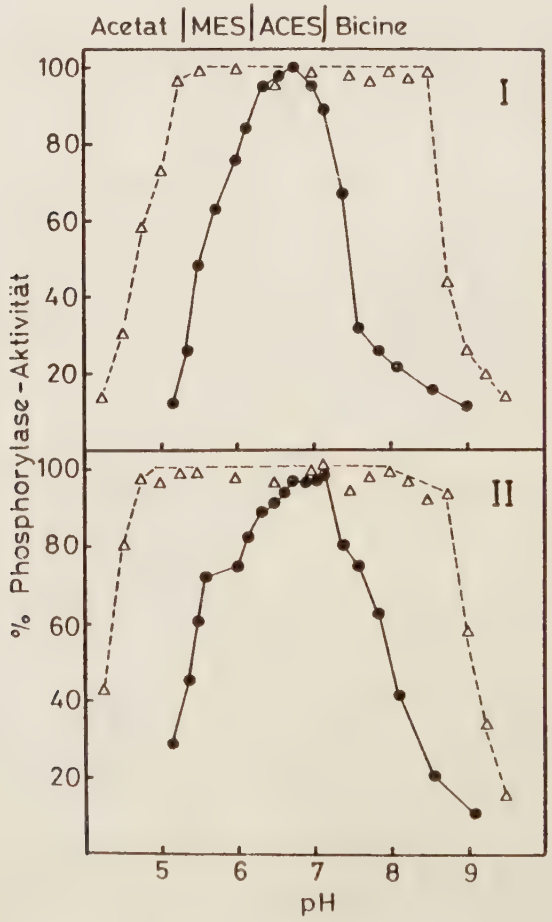


Abb. 16: Aktivität und Stabilität der Phosphorylase in Abhängigkeit vom pH-Wert. Experimentelle Bedingungen siehe Text (3.5.1.).
(●) Aktivität bei verschiedenen pH-Werten
(△) Aktivität bei pH 6.8 nach 10 min Vorinkubation bei verschiedenen pH-Werten

3.5.2. Effekt der Temperatur auf die Phosphorylase-Aktivität

Die apparenten Geschwindigkeiten als Funktion der Temperatur sind in Abb. 17 gezeigt. Bei dieser Versuchsreihe waren die Substratkonzentrationen supramaximal (P_i: 50 mM, Glycogen: 13 mM).
Beide Enzyme erwiesen sich bis einschließlich 40°C als stabil. Oberhalb dieser Temperatur trat eine schnelle Inaktivierung ein. Auffällig ist, daß die Temperaturoptima für beide Reaktionsrichtungen nicht zusammenfielen: Die Geschwindigkeit der Synthesereaktion stieg bis 40°C, die der Abbaureaktion nur bis 30°C an. Da dies darauf hindeuten könnte, daß sich im fraglichen Temperaturbereich (30-40°C) die Eigenschaften der Substratbindungsstellen ändern, wurde untersucht, wie sich die Affinität zu Glycogen (K_G) und die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) mit der Temperatur ändern. Hierbei wurden die Konzentrationen von P_i und G1P konstant supramaximal gehalten, die Glycogenkonzentration zwischen 0.5 und 3.2 mM variiert.

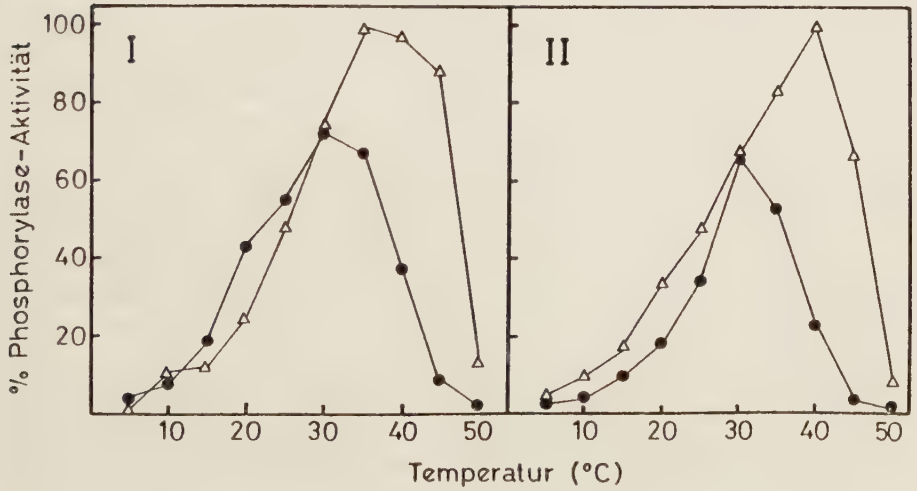


Abb. 17: Apparente Geschwindigkeit der Phosphorylase-Reaktion in Abhängigkeit von der Temperatur.
(●) Aktivität gemessen in Richtung Glycogenabbau
(△) Aktivität gemessen in Richtung Glycogensynthese

Tabelle 6: Einfluß der Temperatur auf den K_M-Wert für Glycogen und V_{max}

Temperatur (°C)	Phosphorylase I		Phosphorylase II	
	K_M (mM)	V_{max} (U/mg)	K_M (mM)	V_{max} (U/mg)
Abbaureaktion				
5	0.27	1.58	0.41	1.42
10	0.30	5.38	0.45	4.10
15	0.33	12.4	0.50	12.02
20	0.39	27.8	0.71	38.7
25	0.38	38.7	0.93	46.7
30	0.93	60.0	1.40	69.2
35	3.94	98.5	6.21	89.1
40	21.2	168.0	30.7	123.1
45	7.87	18.0	10.1	11.0
Synthesereaktion				
5	0.31	0.71	0.35	0.52
10	0.31	2.46	0.40	1.78
15	0.29	7.46	0.40	3.71
20	0.41	17.8	0.39	14.3
25	1.00	52.9	0.45	39.8
30	1.26	65.4	0.81	61.7
35	2.91	125.0	4.25	72.4
40	6.92	143.0	10.8	92.3
45	2.48	43.1	1.98	28.8

Die P_i-Konzentration betrug bei der Abbaureaktion 50 mM, die Konzentration des G1P 60 mM (vgl. 2.8.1.).

Für jede Temperatur wurde aus den vier Meßpunkten ein Lineweaver-Burk-Diagramm erstellt, aus dem dann die jeweilige Maximalgeschwindigkeit sowie der K_M-Wert für Glycogen abgelesen werden konnte (Tab. 6). Die Glycogenkonzentration (13 mM) lag in der Abbaureaktion bei 40 °C schon unterhalb des K_M-Wertes, in der Synthesereaktion aber noch weit darüber. Deshalb nahm die Anfangsgeschwindigkeit der Abbaureaktion schon oberhalb von 30 °C ab. Weiterhin ergab sich für beide Enzyme, unabhängig von der Reaktionsrichtung, eine Optimaltemperatur von 40 °C. Das hieraus abgeleitete Arrhenius-Diagramm für GP-I wies eine deutliche Bruchstelle bei 19 °C (Abbau) bzw. 25 °C (Synthese) auf. Ein ähnliches Bild ergab sich für GP-II (Abb. 18). Die Bruchstelle schien bei GP-II allerdings prononcierter auszufallen. Die mit Hilfe der integrierten Form der Arrhenius-Gleichung

$$\log V_2/V_1 = E_a/19.14 \times (T_1^{-1} - T_2^{-1})$$

errechnete Aktivierungsenergie E_a war bei beiden Enzymen im oberen Temperaturbereich kleiner als im unteren und bei GP-II kleiner als bei GP-I. Bei diesen Zahlen handelt es sich um Durchschnittszahlen für den angegebenen Temperaturbereich. Die Nichtlinearität im Arrhenius-Diagramm, die insbesondere bei oligomeren allosterischen Enzymen des öfteren beobachtet wird (86), läßt sich dahingehend interpretieren, daß bei verschiedenen Temperaturen ein anderer Schritt der komplexen Enzym-Substrat-Reaktion geschwindigkeitsbestimmend wird. Im folgenden sind die Aktivierungsenergien der cardialen Phosphorylasen in kJ/mol angegeben:

Temperaturbereich	GP-I	GP-II
	Abbaureaktion	
5 - 19 °C	126.8	144.8
20 - 40 °C	68.5	44.8
	Synthesereaktion	
5 - 25 °C	146.7	148.6
26 - 40 °C	53.3	39.9

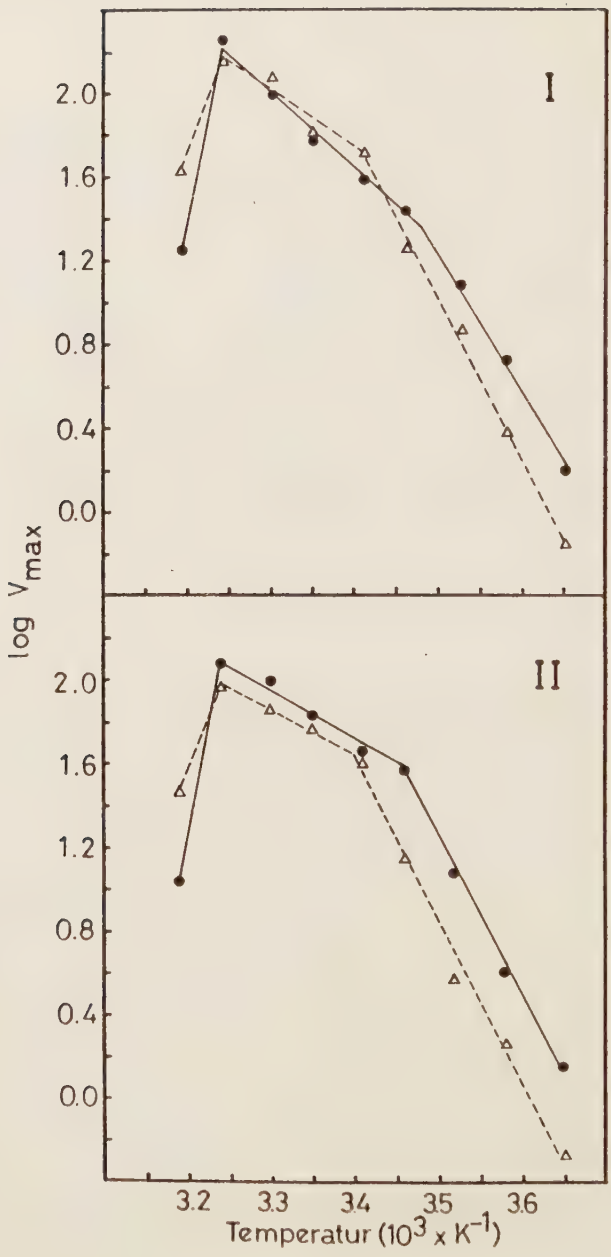


Abb. 18: Arrhenius-Diagramme der cardialen Phosphorylasen zur Bestimmung der Aktivierungsenergie. Zu jeder Temperatur wurde ein Lineweaver-Burk-Plot (Glycogen variiert, P_i bzw. G1P konstant) erstellt, aus dem V_{max} extrapoliert und logarithmisch gegen die reziproke absolute Temperatur aufgetragen wurde.
(●) V_{max} in Richtung Glycogenabbau
(△) V^{max} in Richtung Glycogensynthese

3.5.3. Molekulargewichte der Untereinheiten

Die Kenntnis des Molekulargewichts und der Quartärstruktur ist essentiell, um die geplanten Phosphorylierungsversuche sinnvoll, d.h. auf molarer Basis, auswerten zu können.

Die gereinigten Phosphorylasen wurden nach Hitzedenaturierung in Gegenwart von SDS und einem Reduktionsmittel (DTT) in einem SDS-Gradientengel (5 - 20 % Acrylamid) elektrophoriert (Abb. 19). Da alle vier Präparationen nur jeweils eine Bande aufwiesen, deren Wanderungsstrecke untereinander nahezu identisch war und zudem derjenigen der KSM-GP glich, wurde für alle vier cardialen Isoenzyme gleichermaßen ein Molekulargewicht von 97,400 (vgl. 87) angenommen. Die Abweichung nach unten, die sich ergab, wenn man das M_r auf herkömmliche Weise, d.h. mit Hilfe der Gleichung

$$\log M_r = a - b \log (\% \text{ Acrylamid}) \quad (88)$$

kalkulierte, war vernachlässigbar klein. Die SDS-PAGE der Proben unter nichtreduzierenden Bedingungen zeigte Proteine mit demselben M_r: Rattenherz-GP besitzt wie die KSM-GP keine SS-Brücken.

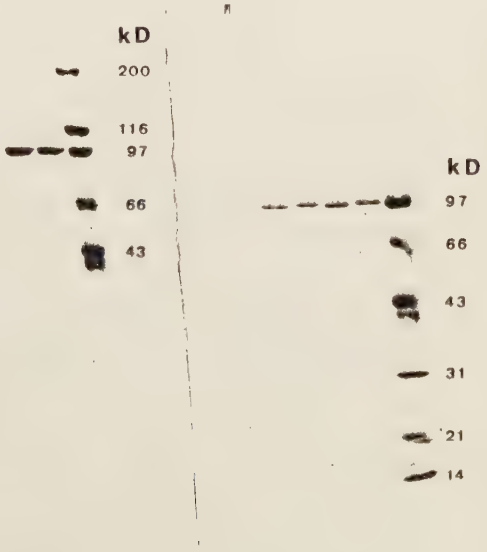


Abb. 19: SDS-Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese (5-20 %) der Phosphorylase-Präparationen. Von links nach rechts Kaninchenskelettmuskel-Phosphorylase, Rattenskelettmuskel-Phosphorylase, Herzphosphorylasen I und II gesunder Ratten, Herzphosphorylasen I und II diabetischer Ratten, Standardproteine

3.5.4. Quartärstruktur der nativen Isoenzyme

A) Native Polyacrylamid-Gradientengel-Elektrophorese (N-PAGE)

Nach Rothe (59) läßt sich das Molekulargewicht (M_r) nativer Proteine unter bestimmten Bedingungen in einem einzigen elektrophoretischen Lauf bestimmen:

1. Das Gel muß einen linearen Polyacrylamidgradienten enthalten
2. Es muß ein kontinuierliches Puffersystem verwendet werden.
3. Die intrinsische Ladung des Proteins darf die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins nicht beeinflussen.
4. Das Protein muß globulär sein.

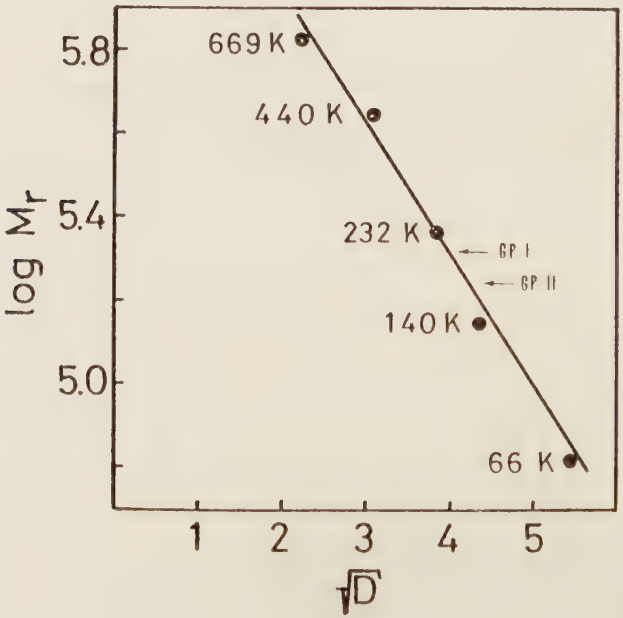


Abb. 20: Auswertung der nativen Polyacrylamid-Gradientengelelektrophorese (Abb. 12) nach Rothe (59). Erläuterungen siehe Text.

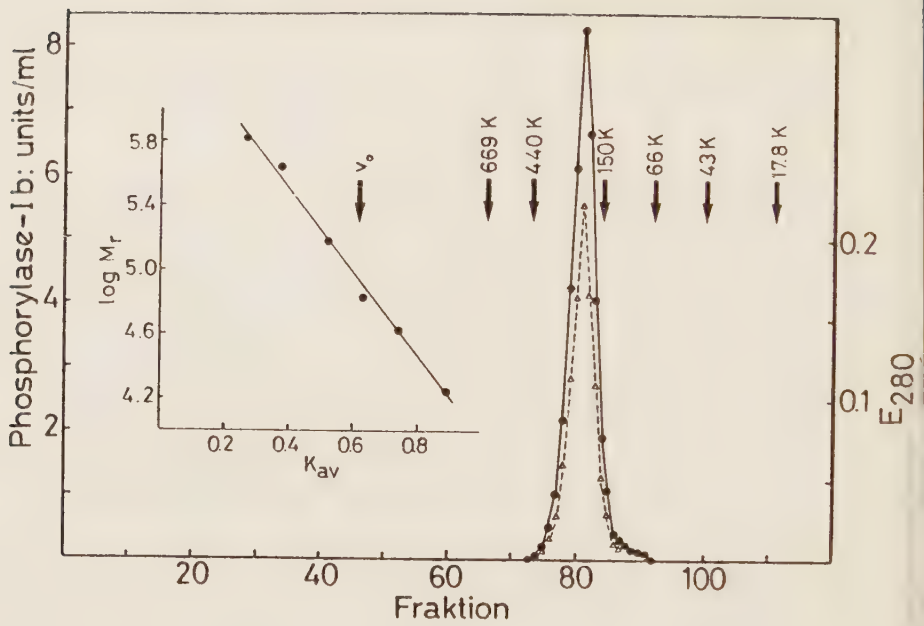
Sind diese Bedingungen erfüllt, so gilt die lineare Beziehung

$$\log M_r = a - b \times D^{1/2},$$

worin D = Wanderungsstrecke des Proteins. Während die ersten beiden Bedingungen unschwer zu erfüllen sind, können die letzten beiden nicht vom Experimentator diktiert werden. Soll das Protein während der Elektrophorese zur Anode wandern, muß es negativ geladen sein. Dies ist der Fall, wenn pH > I.P. Da nach 3.4.3. die isoelektrischen Punkte aller GP-Isoenzyme zwischen 5.4 und 6.25 lagen, wurde als pH-Wert 9.0 gewählt, da dieser im Schnitt immerhin 3 pH-Einheiten vom I.P. entfernt ist und gerade noch eine Aktivitätsmessung (s. 3.5.1.) zuläßt. Über die letzte Bedingung kann naturgemäß keine Aussage gemacht werden.
Abb. 20 zeigt die Ergebnisse dieses Experimentes. Danach betrugen die apparenten Molgewichte der GP-Ib 208,000 und der GP-IIb 170,000. GP-I entsprach damit den Erwartungen und kann aufgrund der bisherigen Ergebnisse als dimeres Molekül betrachtet werden. Das Verhalten der GP-II kann im Zusammenhang mit den anderen Befunden (IEC, IEF, SDS-PAGE) nur so interpretiert werden, daß das Molekül bei gleicher Größe wie GP-I eine wesentlich größere negative Oberflächenladung besitzt.

B) Gelfiltration

Um die Frage des nativen Molekulargewichts abzuklären, wurde zusätzlich die Gelfiltration als ein ladungsunabhängiges Trennverfahren eingesetzt. GP-Ib und IIb wurden im analytischen Maßstab an BIO-SIL TSK 400 chromatographiert (s. 2.4.2.) (Abb. 21). Es wurden jeweils 10 units/50 ul (ca. 250 ug Protein) über eine 50 ul-Probenschleife injiziert. Beide Enzyme zeigten wiederum nur einen Peak, dessen Elutionsvolumen übereinstimmend einem M_r von ca. 200,000 entsprach. Die UV-Absorptionskurve deckte sich mit dem Aktivitätsprofil in beiden Fällen.
Die Ergebnisse der Experimente bezüglich der Quartärstruktur sind im folgenden tabellarisch zusammengefaßt:



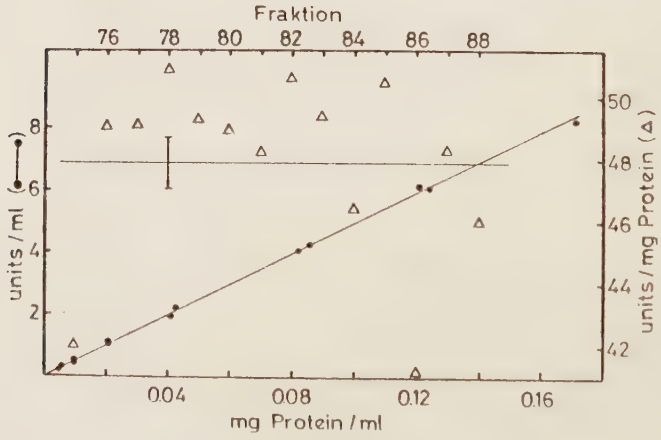


Abb. 21: Analytische FPLC-Gelfiltration der gereinigten Rattenherz-phosphorylase Ib an Bio-Sil TSK-400 (7.5 x 70 mm + 7.5 x 600 mm, V_t = 29.6 ml), äquilibriert mit 0.1 M NaH_2PO_4/NaOH (pH 6.8). Die Flußrate betrug 1 ml/min, die Fraktionsgröße 0.25 ml. Es wurden 10 Units (ca. 0.21 mg) über eine 50 ul-Probenschleife injiziert. Die Säule wurde mit Standardproteinen (Thyroglobulin: 669 kD, Ferritin: 440 kD, γ-Globulin: 150 kD, BSA: 66.2 kD, Ovalbumin: 43 kD, Myoglobin: 17.5 kD) kalibriert. Das Protein wurde in einem einzigen symmetrischen Peak eluiert. Das Verhältnis von Aktivität und Proteinkonzentration war über die gesamte Peakbreite konstant (siehe 21 B). Die auf diese Weise berechnete spezifische Aktivität betrug 49.15 Units/mg, der Mittelwert der spezifischen Aktivität in den Fraktionen 75 bis 88 lag bei 47.8 0.81 Units/mg und lag damit nicht höher als nach der AMP-Sepharose-Chromatographie. Das Gleiche gilt für GP-IIb.

Methode	Parameter	GP-I	GP-II
SDS-PAGE	M_r (Untereinheit)	97,400	97,400
N-PAGE	M_r (nativ)	208,000	170,000
GF	M_r (nativ)	202,000	194,000

Aufgrund dieser Daten wird für beide Rattenherz-Isoenzyme eine dimere Struktur mit M_r = 195,000 (= 2 x 97,400) postuliert.

Zusammenfassend zeichnete sich GP-II durch eine geringfügig größere pH-Stabilität und eine niedrigere Aktivierungsenergie gegenüber GP-I aus. Beide Isoenzyme bestehen aus zwei gleichgroßen, nichtkovalent miteinander verbundenen Polypeptidketten.

3.6. Interkonversionsreaktionen der Phosphorylase-Isoenzyme

1955 entdeckten Fischer und Krebs (4) in der Kaninchenmuskel-GP ein bis zu diesem Zeitpunkt unbekanntes Prinzip der Enzymregulation: die kovalente Modifikation mittels Phosphorylierung. Mit dieser Phosphorylierung ist eine dramatische Änderung der enzymatischen Eigenschaften verbunden: Während die dephosphorylierte Form des Enzyms (GP b) die Gegenwart des allosterischen Cofaktors AMP (42) benötigt, um überhaupt Aktivität zu zeigen (1), ist die phosphorylierte Form (GP a) nicht länger von AMP abhängig. 1958 wurde im selben Labor das phosphorylierende Enzym, die Phosphorylasekinase, identifiziert und die Stöchiometrie der Reaktion aufgeklärt: 1 mol Phosphorylase (Untereinheit) bindet je 1 mol P_i (64). 1977 wurde im Verlauf der Totalsequenzierung die P_i-bindende Aminosäure als Ser-14 identifiziert (87).

Seit dieser Zeit wurde eine Vielzahl (ca. 50) von Enzymen entdeckt, die via Phosphorylierung / Dephosphorylierung modifiziert werden können (89,90). Der Grad der Phosphorylierung (mol P_i/mol Enzym) schwankt dabei beträchtlich, und nicht immer läßt sich die Phosphorylierung einer bestimmten Aminosäure des Proteins mit einem physiologischen Ereignis korrelieren. Als Beispiel hierfür seien nur die Glycogensynthase-Isoenzyme der Ratte genannt: Die Skelettmuskel-

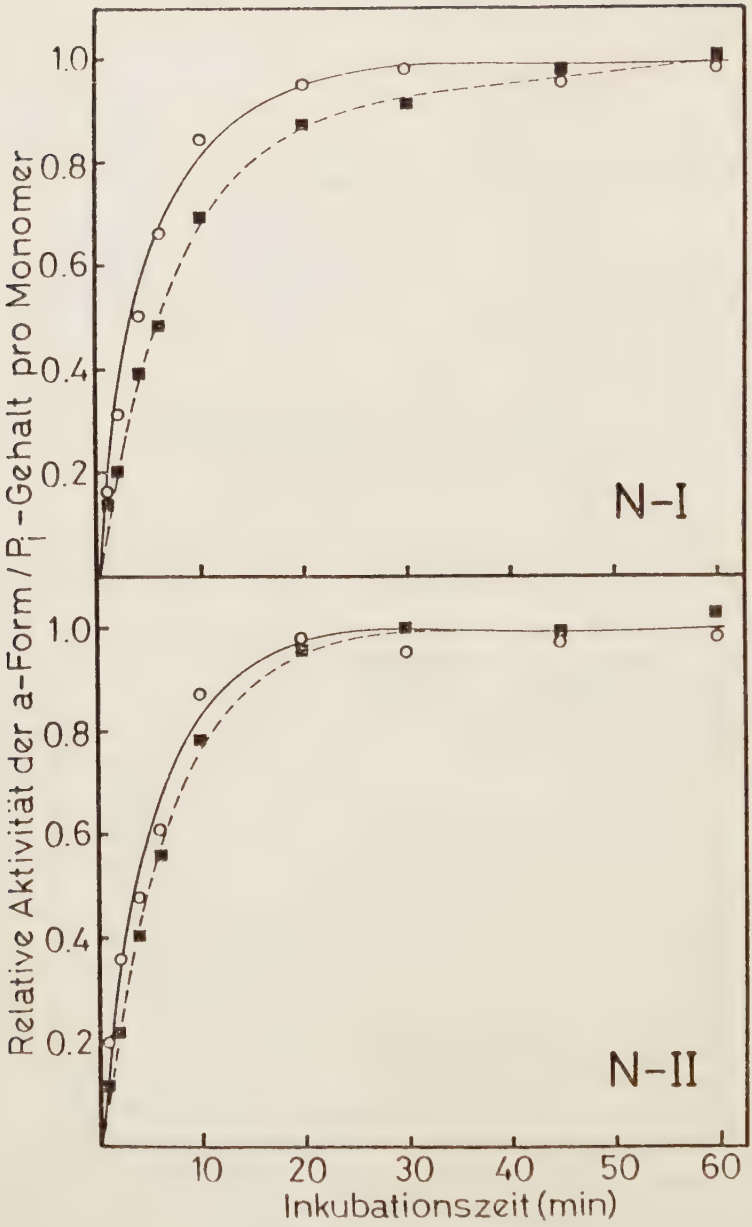
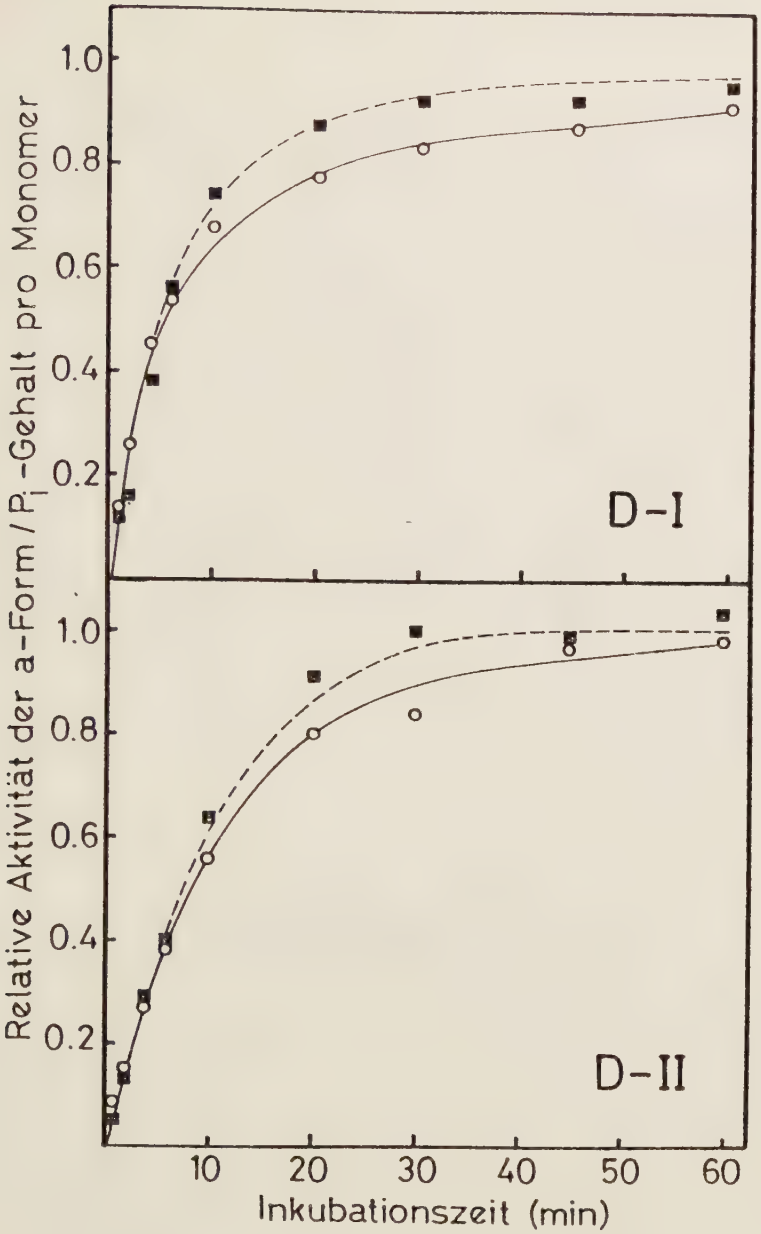


Abb. 22: Zeitlicher Verlauf der Phosphorylase-Phosphorylierung und -Aktivierung mit gereinigter Phosphorylasekinase und (γ-^{32}P)ATP. Die Phosphorylasekonzentration war 180 ug/ml, die Kinasekonzentration 0.45 ug/ml. Weitere experimentelle Bedingungen siehe Kap. 2.12.1. Die maximale Aktivität lag in allen Fällen bei ca. 8.0 Units/ml.
(○) Relativer Anteil der a-Form an der Gesamtaktivität (-AMP/+AMP)
(■) Pro Phosphorylase-Untereinheit inkorporiertes Phosphat


Relative Aktivität der a-Form / P_i-Gehalt pro Monomer
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
D-I
D-II
10
20
30
40
50
60
Inkubationszeit (min)

Synthase wird von vier verschiedenen Kinasen an mindestens 5 Stellen phosphoryliert und baut ca. 2 P_i pro Untereinheit ein (91); dagegen inkorporiert die cardiale Synthase 3 P_i pro Untereinheit mit Hilfe von zwei Proteinkinasen (92), die Leber-Synthase 12 P_i pro Untereinheit (93) mit mindestens 9 Kinasen (94). Dies zeigt, daß Isoenzymformen einer Species in ihrer Regulation auf der Phosphorylierungsebene deutlich voneinander abweichen können.

Frühere Befunde hatten zwar gezeigt, daß beide cardialen GP-Isoenzyme durch Inkubation mit GPK und ATP-Mg in eine AMP-unabhängige Form zu überführen sind (7); es konnte jedoch keine Aussage über den Grad des Phosphateinbaus getroffen werden. Um zu prüfen, ob und wieder P_i-Einbau mit der Aktivierung des Enzyms korreliert ist, wurden Ausmaß und zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung mittels (γ-^{32}P)ATP sowie Dephosphorylierung der ^{32}P-markierten Enzyme studiert. Dazu wurden exogene Enzyme, Phosphorylasekinase und Proteinphosphatase-1, beide aus Kaninichenskelettmuskel, eingesetzt. Ein Parallelversuch mit der KSM-GP, dem natürlichen Substrat der GPK bzw. PP-1 diente dazu, die Gültigkeit und Genauigkeit der Methode zu überprüfen, da die Phosphorylierungseigenschaften dieses Enzyms gut beschrieben sind (s.o.).

3.6.1. Phosphorylierung und Aktivierung

Um eine quantitativ zuverlässige Auswertung dieses Versuches zu gewährleisten, mußten Konzentration und Aktivität der fünf Phosphorylasen sowie der Kinase in allen fünf Ansätzen gleich sein. Deshalb wurden die GP-Präparationen, die in unterschiedlichen Konzentrationen vorlagen, zunächst mittels Centricon-10 konzentriert und dann durch Zugabe verschiedener Mengen Puffer auf gleiche Konzentration gebracht.
Die Aktivität der GPK wurde durch die Messung der Autophosphorylierung erfaßt, welche in allen fünf Ansätzen keine erkennbaren Unterschiede zeigte. Sie stieg zeitabhängig bis zu maximal 6 % der gesamten Proteinphosphorylierung.

Alle vier cardialen Isoenzyme waren wie das Kaninchenmuskelenzym in der Lage, pro Untereinheit je 1 Molekül P_i zu inkorporieren (Abb. 22). Das Autoradiogramm des SDS-Gels wies in allen Fällen nur einen Radioaktivitätspeak auf, der mit der 97.4 kD-Bande zusammenfiel (Abb. 23). Die Phosphorylierung hatte somit erwartungsgemäß keinen Einfluß auf das Molekulargewicht der Untereinheit.

Die enzymatische Aktivität in Abwesenheit von AMP nahm parallel mit steigendem Phosphatgehalt zu (Abb.22). Der -/+ AMP-Quotient erreichte übereinstimmend Werte um 0.95. Die AMP-unabhängige Form der cardialen Isoenzyme wurde in Analogie zur KSM-GP als Phosphorylase a bezeichnet.

Zwischen den beiden Parametern Relative a-Aktivität und Phosphatgehalt bestand eine eindeutige Korrelation (Abb. 24). Wie im Falle der KSM-GP ist bei den cardialen Enzymen der relative Anteil der AMP-unabhängigen Aktivität an der Gesamtaktivität ein gutes Maß für den Phosphorylierungsgrad.

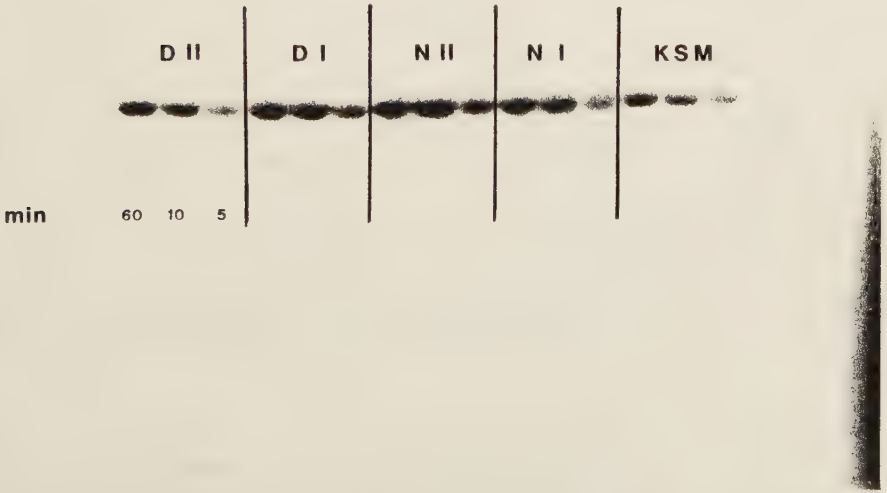


Abb. 23: Autoradiogramm des SDS-Gradientengels (10-20 % Acrylamid), auf das aliquote Teile der Phosphorylierungsansätze jedes Isoenzyms aufgetragen wurden.

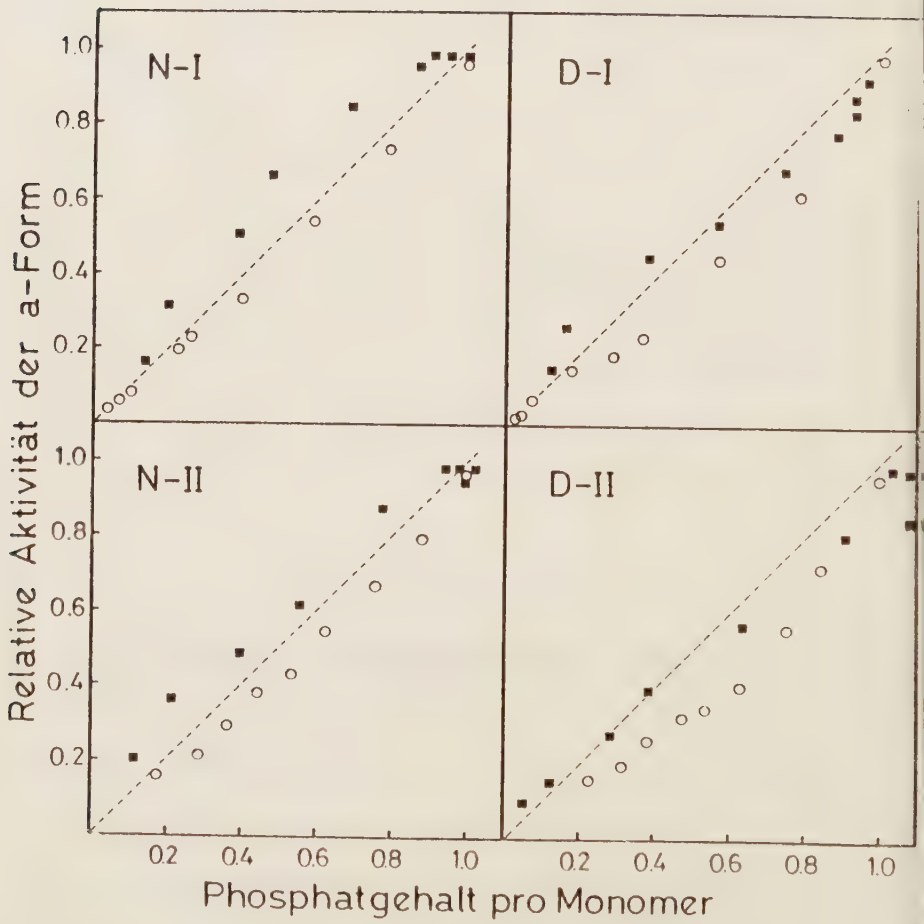


Abb. 24: Relativer Anteil der a-Form (in Abwesenheit von AMP gemessen) an der Gesamtaktivität (in Gegenwart von AMP gemessen) als Funktion des kovalent gebundenen Phosphats während der Phosphorylierung (■) bzw. Dephosphorylierung (○). ----- Postulierte theoretische Einheitsgerade

Unterschiede zwischen den Isoenzymformen ergaben sich erst bei der Abschätzung der Reaktionsgeschwindigkeiten, die mit Hilfe der linearen Abschnitte (Bedingung: $r > 0.990$) in den Abbildungen 22 a bis d vorgenommen wurde:

Enzym	Inkorporiertes Phosphat in P_i/GP pro min	b→a-Konversion in % pro min
KSM	0.041 (r=0.992,10 min)	7.6 (r=0.999, 6 min)
N-I	0.094 (r=0.993, 4 min)	15.5 (r=1.000, 2 min)
N-II	0.092 (r=0.997, 6 min)	18.0 (r=0.998, 2 min)
D-I	0.093 (r=0.996, 6 min)	11.0 (r=0.994, 4 min)
D-II	0.064 (r=0.998,10 min)	6.3 (r=0.999,10 min)

Offensichtlich waren die cardialen Isoenzyme der Ratte ein "besser geeignetes" Substrat für die GPK als deren natürliches Substrat. Die Phosphorylierungsgeschwindigkeit der beiden Isoenzyme N-I und N-II war mehr als doppelt so groß wie die der KSM-GP. Die gleiche Beobachtung machten auch Sevilla und Fischer (95) bei ihrer Studie über die Rattenskelettmuskel-GP. Ob dieser Befund physiologisch bedeutungsvoll ist oder nur den Status bzw. die Entstehungsgeschichte der beteiligten Enzympräparationen wiederspiegelt, ist nicht bekannt.
D-I wurde mit vergleichbarer Geschwindigkeit phosphoryliert; der relative Anteil der Enzymmoleküle, die pro Zeiteinheit in a-Moleküle umgewandelt wurden, war jedoch beträchtlich kleiner; d.h. die physiologisch relevante enzymatische Aktivierung hielt zeitlich nicht in dem Maße Schritt mit der chemischen Modifikation wie im Falle des Normalenzyms N-I b. Gleiches galt für D-II: Gegenüber N-II war die Phosphorylierungsgeschwindigkeit um 1/3, die Aktivierungsgeschwindigkeit jedoch überproportional um 2/3 verringert.

Um eine weitere Charakterisierung der ^{32}P-Phosphorylase a anschließen zu können, wurde die ^{32}P-Markierung der cardialen Isoenzyme in präparativem Maßstab durchgeführt (s. 2.6.).

Die cardialen Isoenzyme unterschieden sich insofern von der KSM-GP, als bei der abschließenden Dialyse gegen Puffer E keine Kristallisation eintrat. Verantwortlich hierfür ist wahrscheinlich die aus technischen Gründen sehr viel niedrigere GP-Konzentration (bis herab zu 0.4 mg/ml). Die proteingebundene Radioaktivität stimmte jedoch mit den Ergebnissen der analytischen Versuche überein. Die Wiederfindung betrug wie bei der KSM-GP 70 bis 80 % des eingesetzten Proteins.

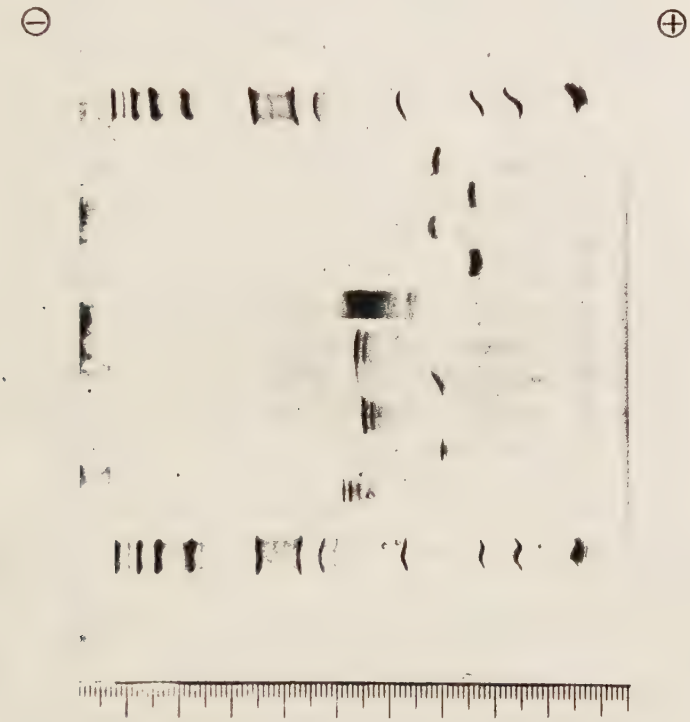
3.6.2. Isoelektrische Punkte der Phosphorylase-Isoenzyme

Das Verhalten der GP-Isoenzyme in einem künstlichen pH-Gradienten wurde untersucht, um die isoelektrischen Punkte der reinen dephosphorylierten und phosphorylierten Isoenzyme mit den im Rohextrakt gefundenen Aktivitätsbanden (vgl. 3.4.3.) zu vergleichen.
Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abb. 25 dargestellt. Die Coomassie-gefärbten Gele zeigten für jede Präparation nur eine Bande, deren Lage mit der nativ gefärbten Bande übereinstimmte. Da bekanntlich die Auflösung der IEF wesentlich größer ist als die der SDS-PAGE, ist dieser Befund ein eindrucksvollerer Hinweis auf die Reinheit der Präparation.
In Tab. 7 sind die so erhaltenen I.P.-Werte den im Rohextrakt gefundenen gegenübergestellt.

Tab. 7: Isoelektrische Punkte der Phosphorylase-Isoenzyme

		I b			I a	II b	II a
Reine Enzyme	N	6.30			5.60	5.55	5.25
	D	6.25			5.65	5.50	5.25
Herzmuskelextrakt	N	6.25	5.90	5.70		5.50	
KSM		6.15			6.40		

Abb. 25: Isoelektrische Fokussierung der gereinigten Phosphorylase-Isoenzyme im pH-Gradienten (3.5 bis 9.5) (vgl. Abb. 15). Von oben nach unten: Standardproteine, Herzphosphorylasen Ia und IIa gesunder Ratten, Herzphosphorylasen Ia und IIa diabetischer Ratten, Kaninchenmuskelphosphorylase a, Herzphosphorylasen Ib und IIb gesunder Ratten, Herzphosphorylasen Ib und IIb diabetischer Ratten, Kaninchenmuskelphosphorylase b, Standardproteine.



Wie zu erwarten war, verschob sich der I.P. durch die Einführung einer Phosphatgruppe (maximal 6 negative Ladungen pro Dimer) in den sauren Bereich. Dieser Unterschied fiel bei GP-I deutlicher aus (0.7 pH-Einheiten) als bei GP-II (0.3 pH-Einheiten).
Die gefundenen I.P.s entsprachen der Elutionsreihenfolge der GP-Isoenzyme bei der Anionenaustauschchromatographie.

Nur zwei im Herzmuskelextrakt gefundene GP-Species stimmten in ihrem I.P. mit den gereinigten Isoenzymen überein: Ib und IIb (oder Ia). Die dazwischenliegenden I.P.s 5.9 und 5.7 stellten wahrscheinlich partiell phosphorylierte Formen der GP-Ib dar.

3.6.3. Native Molekulargewichte der phosphorylierten Phosphorylasen

Frühe Untersuchungen zu dieser Fragestellung mittels Gelfiltration bzw. analytischer Ultrazentrifugation hatten ergeben, daß KSM-GP in der a-Form, d.h. in der phosphorylierten Form tetramere Moleküle (a_4) mit M_r = 360,000 (96) bzw. 370,000 (97) bildet. Bei diesen Versuchen lagen die verwendeten GP-Konzentrationen sehr hoch (i.e. mg/ml). Metzger et al. (98) fanden jedoch, daß nur dimere GP a (a_2) in der Lage ist Glycogen zu binden. Dem entsprach der Befund von Huang und Graves (99), daß a_4 nahezu inaktiv ist. Die Lage des Gleichgewichtes $2\ a_2 \rightleftharpoons a_4$ ist abhängig von der GP-Konzentration (78) und der Temperatur (100,101): Je höher die GP-Konzentration und je tiefer die Temperatur, desto mehr wird der inaktive tetramere Zustand begünstigt. Daß in den eingangs zitierten Versuchen der tetrameren a-Form Aktivität zugeschrieben wurde, mag daran liegen, daß diese natürlich erst nach hoher Verdünnung gemessen werden kann, wodurch das Gleichgewicht in Richtung a_2 gedrückt wird.

Um den fraglichen Effekt der Phosphorylierung auf das native Molekulargewicht zu untersuchen, wurden die ^{32}P-markierten Isoenzyme mittels FPLC-Gelfiltration (s. 2.4.2.) analysiert. Um einer in Frage stehenden Tetramerisierung entgegenzuwirken, wurden die Säulenläufe bei 25 ^{0}C durchgeführt und die Enzyme in sehr geringer Konzentration (4.9 ug/50 ul) aufgetragen.
An das Durchflußphotometer war ein Integrator angeschlossen. Mit den von diesem Gerät ausgedruckten Retentionszeiten (korrigiert um die Verzögerung zwischen Säulenauslauf und Photometer) wurden die Elutionsvolumina V_e kalkuliert. Sofort nach Erhalt der Peakfraktionen wurden aliquote Teile davon vereinigt und in ihnen die enzymatische Aktivität bestimmt. Die ^{32}P-bedingte Radioaktivität wurde in jeder Fraktion gezählt.
Unter diesen Bedingungen wurden KSM-GPa sowie die cardialen Phosphorylasen vom Typ Ia mit einem dem Molgewicht der b-Form entsprechenden Volumen eluiert (s. Abb. 21, Kap.3.5.4.). Die Phosphorylasen vom Typ IIa dagegen wurden in zwei Peaks eluiert (Abb. 26), deren M_r sich wie 2:1 verhielten. Daraus folgt, daß der zuerst eluierte Peak

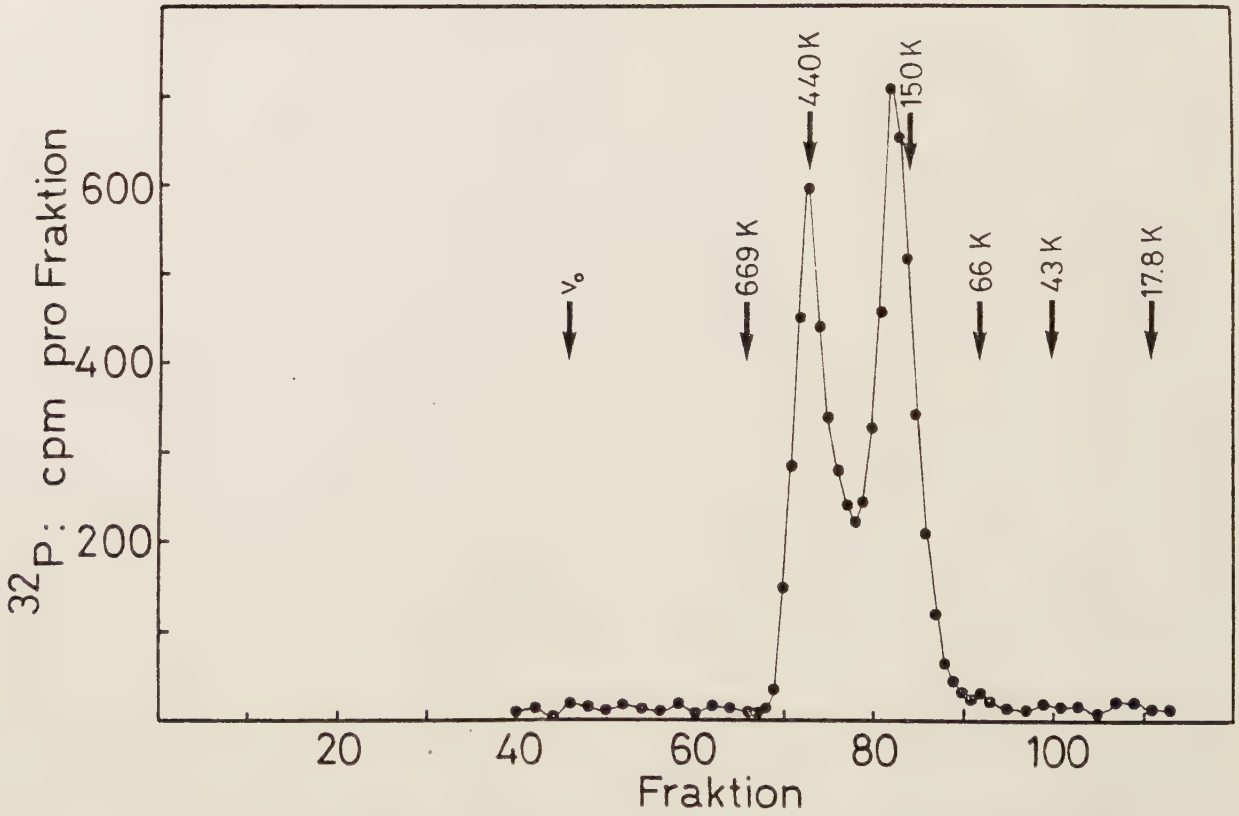


Abb. 26: Analytische FPLC-Gelfiltration der ^{32}P-Phosphorylase IIa aus Rattenherz an Bio-Sil TSK-400. Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 21. Es wurden ca. 8000 cpm = 4.9 ug Phosphorylase über eine 50 ul-Probenschleife injiziert. GP-IIa wurde in zwei Peaks entsprechend den Molgewichten 390 kD und 188 kD eluiert. Das gleiche Bild ergab sich für GP-IIa aus diabetischen Herzen.

als tetramere a-Form betrachtet werden kann. Übereinstimmend machte bei N-II und D-II die tetramere Species etwa 1/3 der Gesamtmenge aus. Beide Peaks, a_4 und a_2, zeigten die gleiche spezifische Aktivität wie vor dem Lauf. Nach Einengung und Rechromatographie des Peaks N-Ia_2 trat wiederum eine Aufspaltung in a_4 und a_2 ein. Dies spricht für eine schnelle Einstellung des Gleichgewichts $2\ a_2 \rightleftharpoons a_4$ (Tab. 8).

Tab. 8: Gelfiltration ^{32}P-markierter GP-Isoenzyme

	KSM	N-I	N-II	D-I	D-II
Elutionsvolumen (ml)			18.06		18.04
Molgewicht (kD)			390		393
% Fläche			34		30
Elutionsvolumen (ml)	20.18	20.10	20.30	20.20	20.15
Molgewicht (kD)	196	201	188	194	198
% Fläche	100	98	66	97	70

3.6.4. Dephosphorylierung und Inaktivierung

In diesen Versuchen interessierten die myocardialen Phosphorylasen wiederum nur als Substrat der exogenen Proteinphosphatase-1.

In der PP-Aktivitätsbestimmung (vgl. 2.8.5.) beträgt die GPa-Konzentration 1 mg/ml und das Enzym/Substrat-Verhältnis 1:30,000. Unter diesen Bedingungen folgt die Dephosphorylierungsreaktion einer Kinetik nullter Ordnung über mindestens 10 min. In dieser Zeit werden etwa 10 % des Substrats umgesetzt.

In den hier geplanten Versuchen konnte die GPa-Konzentration aus technischen Gründen nur 1/10 bis 1/5 der im Standardassay verwendeten betragen, und außerdem sollte der Zeitverlauf der Reaktion einer Kinetik erster Ordnung gehorchen. Deshalb wurde die Menge der PP-1, die nötig ist, um in ca. 1 h eine nahezu vollständige Dephosphorylierung des Substratproteins herbeizuführen, in einem Vorversuch ermittelt. Dazu wurde das Verhältnis PP-1/KSM-GP zwischen 1:20,000 und 1:1,000 variiert. Die GPa-Konzentration betrug 100 ug/ml. Bei einem Verhältnis von 1 ug Phosphatase pro mg Phosphorylase entsprach der Reaktionsverlauf den genannten Bedingungen.

Unter diesen Bedingungen waren bei der KSM-GP und den beiden cardialen Isoenzymen N-I und D-I nach 60 min mehr als 90 % des proteingebundenen P_i hydrolysiert; N-II und D-II dagegen wurden sehr viel langsamer dephosphoryliert. Der Verlust des kovalent gebundenen P_i war in allen Fällen mit einem Aktivitätsverlust, ablesbar an dem fallenden -/+ AMP-Quotienten, verbunden (Abb. 27). Die Abschätzung der Initialgeschwindigkeiten (vgl. 3.6.1.) führte zu folgenden Ergebnissen:

Enzym	Hydrolysiertes Phosphat in P_i pro min	a→b-Konversion in % pro min
KSM	0.047 (r=-0.992,10 min)	7.4 (r=-0.985, 5 min)
N-I	0.082 (r=-0.992, 5 min)	11.5 (r=-1.000, 2 min)
N-II	0.048 (r=-0.996, 5 min)	5.8 (r=-0.974, 5 min)
D-I	0.086 (r=-0.992, 5 min)	18.5 (r=-1.000, 2 min)
D-II	0.047 (r=-0.972, 5 min)	11.5 (r=-1.000, 2 min)

Diese Daten zeigen wiederum, daß die cardialen Phosphorylasen, diesmal nur die vom Typ I, der exogenen Proteinphosphatase-1 zugänglicher waren als deren natürliches Substrat. Die cardialen Phosphorylasen vom Typ II wurden nur halb so schnell dephosphoryliert wie die vom Typ I. Dies liegt wahrscheinlich an dem in 3.6.3. beschriebenen

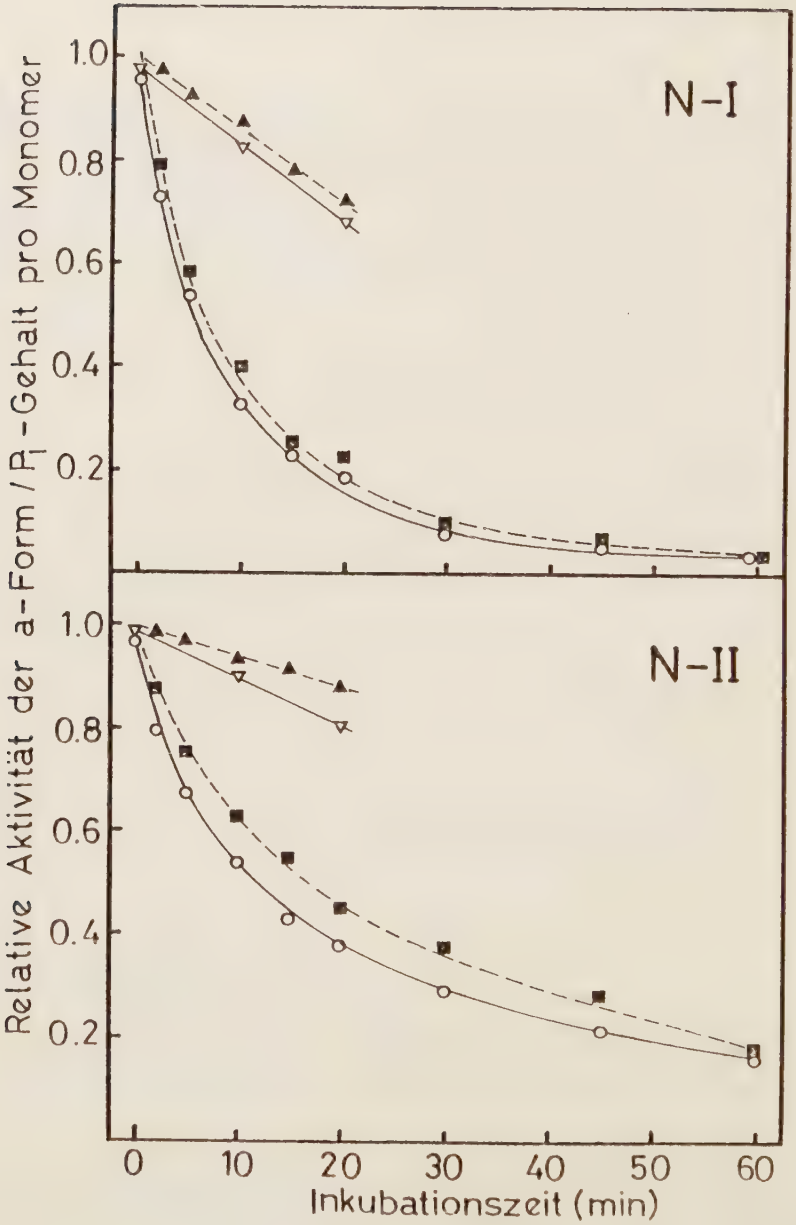
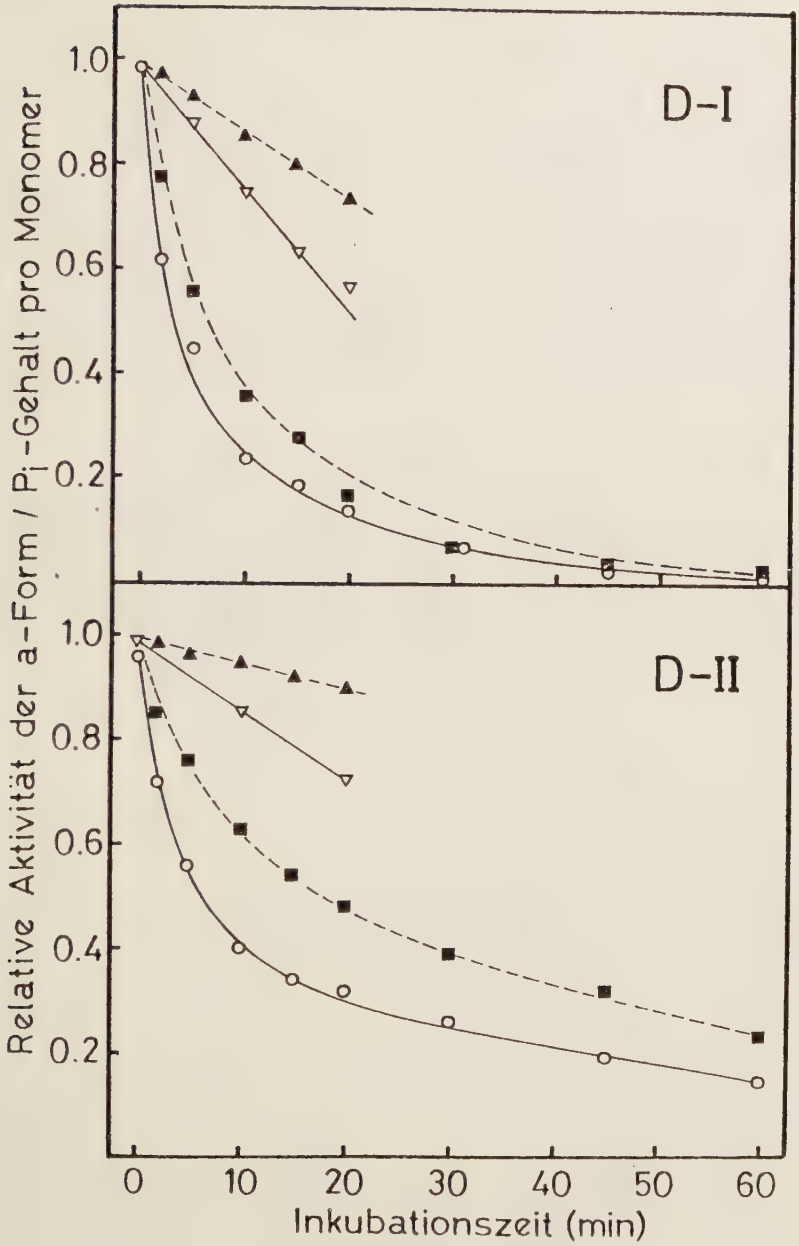


Abb. 27: Zeitlicher Verlauf der ^{32}P-Phosphorylase-Dephosphorylierung und -Inaktivierung mit gereinigter Proteinphosphatase-1. Die maximale Aktivität lag bei ca. 5.0 Units/ml. Offene Symbole: Relativer Anteil der a-Form an der Gesamtaktivität, geschlossene Symbole: pro Phosphorylase-Untereinheit kovalent gebundenes Phosphat.
(■,○) Phosphorylase: 100 ug/ml, Proteinphosphatase-1: 100 ng/ml
(▲,▽) Phosphorylase: 200 ug/ml, Proteinphosphatase-1: 20 ng/ml


D-I
D-II
Relative Aktivität der a-Form / P_i-Gehalt pro Monomer
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
10
20
30
40
50
60
Inkubationszeit (min)

Dimer-Tetramer-Gleichgewicht bei GP-II, da nur dimere GPa-Moleküle von der Phosphatase als Substrat akzeptiert werden (82,100,101).

Zwischen diabetischen und normalen Enzymen bestand auf der Ebene der Dephosphorylierung kein Unterschied.

Bei Analyse der enzymatischen Inaktivierung hingegen fiel auf, daß diese bei D-I und D-II bedeutend schneller erfolgte als bei den entsprechenden Enzymen aus Kontrollherzen. Dieser Befund konnte mit unabhängigen Enzympräparationen sowohl der Phosphorylasen als auch der Proteinphosphatase-1 bestätigt werden.

Um dieses Ergebnis, das im physiologischen Sinne gut zu dem Verhalten der Enzyme aus diabetischem Herzen während der Phosphorylierung paßt (s.u.) zu erhärten, wurde dieses Experiment unter Bedingungen wiederholt, in denen die lineare Phase der P_i-Abspaltung mindestens 20 min dauerte (Kinetik nullter Ordnung). Dazu wurde die GP-Konzentration auf 200 ug/ml erhöht, das Enzym/Substrat-Verhältnis betrug 1:10,000.

Enzym	Hydrolysiertes Phosphat in P_i/GP pro min	a→b-Konversion in % pro min
N-I	0.014 (r=-0.998)	1.45
N-II	0.006 (r=-0.999)	0.95
D-I	0.013 (r=-0.998)	2.35
D-II	0.006 (r=-0.998)	1.35

Aus der Tabelle geht hervor, daß wie in den bisher beschriebenen Interkonversionsreaktionen die lineare Phase der a-b-Umwandlung kürzer war als die der P_i-Reaktion. Auch unter Bedingungen einer Kinetik nullter Ordnung wurden die GP-Isoenzyme aus diabetischen Herzen bei gleicher P_i-Hydrolyserate initial wesentlich schneller inaktiviert als die Kontrollherz-Phosphorylasen (Abb. 27).

Wie an anderer Stelle gezeigt (vgl. 3.2.2.), wird die Dephosphorylierung der Phosphorylase durch PP-1 schon durch mikromolare Konzentrationen an AMP gehemmt. Um zu überprüfen, ob die unterschiedlichen Dephosphorylierungs- bzw. Inaktivierungsraten auf AMP-Kontamination der Enzympräparationen zurückzuführen sind, wurden die vier cardialen Isoenzyme in Gegenwart von 2 uM AMP mit PP-1 inkubiert. Wie erwartet war die Dephosphorylierungs- und Inaktivierungsrate zwar gegenüber den Versuchen in Abwesenheit von AMP deutlich vermindert; die bisher beobachteten Unterschiede waren jedoch vollständig reproduzierbar.

Die bei diesen Versuchen beobachtete erhöhte Inaktivierungsrate und die bei der Phosphorylierung beobachtete verlangsamte Aktivierung der diabetischen Isoenzyme beinhaltet im Vergleich zu den Normalenzymen physiologisch eine gleichsinnige Veränderung: Bei in der Anfangsphase einer Interkonversionsreaktion gleichem P_i-Gehalt war die AMP-unabhängige Enzymfraktion (Phosphorylase a) kleiner als im Falle von N-I und N-II. Wie an anderer Stelle ausführlich diskutiert, deutet dies auf einen intrinsischen Defekt der aus diabetischen Herzen stammenden Phosphorylasen hin (s.S. 99 f.).

3.6.5. Proteinphosphatase-Aktivitäten in diabetischen Rattenherzen

Obwohl bis heute die molekularen Mechanismen der Insulinwirkung unklar sind, werden die Proteinphosphatasen, da sie biosynthetische Enzyme aktivieren, oft als Zielenzyme dieses Hormons aufgefaßt (Review 13). Ein Insulinmangelzustand könnte demzufolge auch Veränderungen der Proteinphosphatase-Aktivitäten hervorrufen. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden die PP-Aktivitäten in Herzmuskelextrakten von normalen, akut-diabetischen und chronisch-diabetischen Ratten gemessen.

Tabelle 9 zeigt, daß die gesamte Phosphorylase-Phosphatase-Aktivität weder im akut- noch chronisch-diabetischen Herzen wesentlich verändert ist. Dagegen scheint die PP-1 kontinuierlich abzunehmen, PP-2A verändert sich nur unwesentlich. Wie die Arbeitsgruppe von Cohen

Tabelle 9: Proteinphosphatase-Aktivitäten in Herzextrakten gesunder, akut-diabetischer und chronisch-diabetischer Ratten

Tierart	(Protein) mg/ml	Phosphorylase-Phosphatase units/mg	Protein-phosphatase-1 units/mg	Protein-phosphatase-2A units/mg	% Protein-phosphatase-1
Kontrolle	8.42 ± 0.85	5.78 ± 0.34	3.48 ± 0.25	2.30 ± 0.11	60.0 ± 1.1
akut-diabetisch	7.18 ± 0.51	5.92 ± 0.36	2.92 ± 0.22	2.99 ± 0.15[2]	49.4 ± 1.0[2]
chronisch-diabetisch	7.84 ± 0.44	5.04 ± 0.16	2.42 ± 0.13[2]	2.61 ± 0.06[1]	48.0 ± 1.1[2]

Die Herzextrakte wurden wie in Kap. 2.5.3. beschrieben hergestellt. Die Proteinphosphatase-Aktivität wurde mit ^{32}p-Phosphorylase als Substrat (10.2 µM) gemessen. Es wurde die für anorganisches Phosphat spezifische Methode (vgl. Kap. 2.8.5.) benutzt.
PP-2A = Aktivität in Gegenwart von Heparin (0.25 mg/ml), PP-1 = Totalaktivität minus PP-2A

[1] $p < 0.05$ versus Kontrolle

[2] $p < 0.01$ versus Kontrolle

kürzlich gezeigt hat, werden PP-1 und PP-2A von verschiedenen Genen codiert (70). Die Tatsache, daß die PP-1 nach vierwöchigem Diabetes um ca. 30 % abgefallen war, könnte bedeuten, daß Insulin spezifisch die PP-1 induziert.

Nach Foulkes und Jefferson nahm im akut-diabetischen Herzen die PP-1 ebenfalls leicht ab, die PP-2A stieg leicht an (102); es wurde jedoch keine statistische Signifikanz erreicht. Außerdem lagen die spezifischen Aktivitäten um den Faktor 5 bis 6 niedriger, und der PP-1-Anteil an der Phosphorylase-Phosphatase-Aktivität war hier niedriger als der PP-2A-Anteil. Hierzu sollte angemerkt werden, daß diese Autoren die Proteinphosphatasen bei alkalischem pH (8.3) extrahiert und die Enzyme mit Mn^{2+}, einem Inhibitor der PP-1, vorinkubiert hatten.

3.7. Peptide Mapping

Die bisherigen Versuche haben Unterschiede einerseits zwischen GP-I und GP-II (I.P., immunologische Nicht-Identität, pH-Stabilität, Aktivierungsenergie, Dephosphorylierung, Dimer-Tetramer-Gleichgewicht) und andererseits zwischen normalen und diabetischen Isoenzymen (drastisch verringerte Ausbeute bei der Präparation, verlangsamte Aktivierung, beschleunigte Inaktivierung) ergeben. Diese Unterschiede können ihre Ursache in einer veränderten Konfiguration (der Subunits untereinander) oder Konformation (des Monomers) haben. Da die Konformation bzw. Tertiärstruktur eines Proteins letztlich durch die Aminosäuresequenz dirigiert wird, erschien das sog. Peptide Mapping im Anschluß an eine proteolytische Verdauung geeignet, die oben angedeutete Hypothese zu verifizieren, denn das Muster der Spaltpeptide ist

1. abhängig von der Zahl der maximal möglichen bzw. zugänglichen Spaltstellen und damit
2. charakteristisch für das Proteinsubstrat und das proteolytische Enzym.

Als Proteasen wurden Trypsin und Chymotrypsin mit den Spaltspezifitäten Lys- und Arg- bzw. Phe-, Trp- und Tyr- verwendet.

3.7.1. Kaninchenskelettmuskel-Phosphorylase

Da man einerseits davon ausgehen konnte, daß KSM-GP und die cardialen Phosphorylasen der Ratte verwandte Enzyme sind, andererseits von den letzteren nicht sehr viel Material zur Verfügung stand, wurden Vorversuche mit der KSM-GP durchgeführt, um die Methode hinsichtlich Substratprotein- und Proteasekonzentration, Reaktionszeit sowie Analysierbarkeit mittels SDS-PAGE und Autoradiographie zu optimieren. Die Gele und ggf. die Autoradiogramme wurden densitometrisch ausgewertet.

In der Literatur sind bisher nur Experimente beschrieben worden, die sich mit dem Abbau nativer Phosphorylase durch Proteasen befassen. Trypsin überführt Phosphorylase a in sog. Phosphorylase b', die wie die intakte b-Form nur in Gegenwart von AMP aktiv ist (64). Während der a→b'-Umwandlung wird pro Untereinheit ein Hexapeptid entfernt, das das phosphorylierte Serin enthält (53). GP b' kann demzufolge nicht mehr phosphoryliert werden. Auch native Phosphorylase b wird durch Trypsin bzw. trypsinähnliche Proteasen (103,104) in die b'-Form überführt.

Diese Befunde wurden durch eigene Versuche bestätigt. Der einzige Effekt des Trypsins auf ^{32}P-Phosphorylase a bestand in der Freisetzung eines TCA-löslichen radioaktiven Peptids, ohne die ursprüngliche 97.4 kD-Bande sichtbar zu verändern. Der Zunahme der Radioaktivität im TCA-Überstand entsprach im Autoradiogramm der kontinuierliche Verlust der Radioaktivität in der persistierenden 97.4 kD-Bande. Von Chymotrypsin wurde native GP a überhaupt nicht angegriffen.

Um verwertbare Spaltpeptidmuster im Sinne der eingangs beschriebenen Fragestellung zu erhalten, wurden die Enzyme vor der proteolytischen Verdauung bei 100 °C mit SDS und DTT denaturiert, was die Zahl der Angriffspunkte für die Proteasen aufgrund der damit verbundenen Entfaltung beträchtlich erhöht (105).

Die Abb. 28 und 29 zeigen den zeitlichen Verlauf der proteolytischen Verdauung bei einem Enzym/Substrat-Verhältnis von 1:1000.

Phosphorylase a: Infolge der Denaturierung verlief jetzt die chymotryptische Spaltung schneller und gründlicher als die durch Trypsin, die wie im Falle des nativen Enzyms das originäre Protein kaum veränderte und nur in den ersten Minuten fortzuschreiten schien. Auch die Zahl der entstandenen chymotryptischen Fragmente war größer. TCA-lösliche Radioaktivität war in beiden Fällen nicht nachzuweisen.

Phosphorylase b: Im Vergleich zur a-Form verliefen beide Verdauungsreaktionen schneller und produzierten dementsprechend eine größere Zahl an Fragmenten. Die Dephosphorylierung hat einen deutlichen Effekt auf die Spaltbarkeit durch Trypsin: Die b-Form war nach 10-20 min vollständig verdaut.

Schlußfolgerungen: In der nativen Konformation sind die aromatischen Aminosäuren völlig unangreifbar; sie liegen wahrscheinlich im Innern der Polypeptidkette. Das gleiche gilt weitgehend für die basischen Aminosäuren Lys und Arg, wie es für ein Protein mit saurem I.P. auch zu erwarten ist. Nur zwei basische Aminosäuren in Nachbarschaft des Phosphoserins, welches 14 Aminosäuren vom N-Terminus entfernt liegt (87), sind angreifbar.

Weshalb Phosphorylase a und b selbst in denaturiertem, also entfalteten Zustand unterschiedliche Peptidmuster ergeben, ist unklar.

3.7.2. Rattenherzphosphorylasen

Phosphorylase a: Wurden die phosphorylierten Isoenzyme nach Denaturierung bis zu 80 min mit Proteasen inkubiert (im Verhältnis 1:1000), zeigten sich alle Enzyme schon nach 5 min resistent gegenüber einer weitergehenden Verdauung: Die bis dahin entstandenen Banden veränderten sich praktisch nicht mehr. Deshalb wurden die cardialen Enzyme jeweils 15 min mit steigenden Mengen an Protease inkubiert. Erst jetzt kam der deutliche Unterschied zwischen den Peptidmustern von GP-I und GP-II zum Ausdruck (Abb. 30 a und c). GP-II schien außerdem von beiden Proteasen schneller verdaut zu werden. Auch die radioaktiven Peptide der GP-II unterschieden sich in Zahl und Größe von denen der GP-I (Abb. 30 b und d).

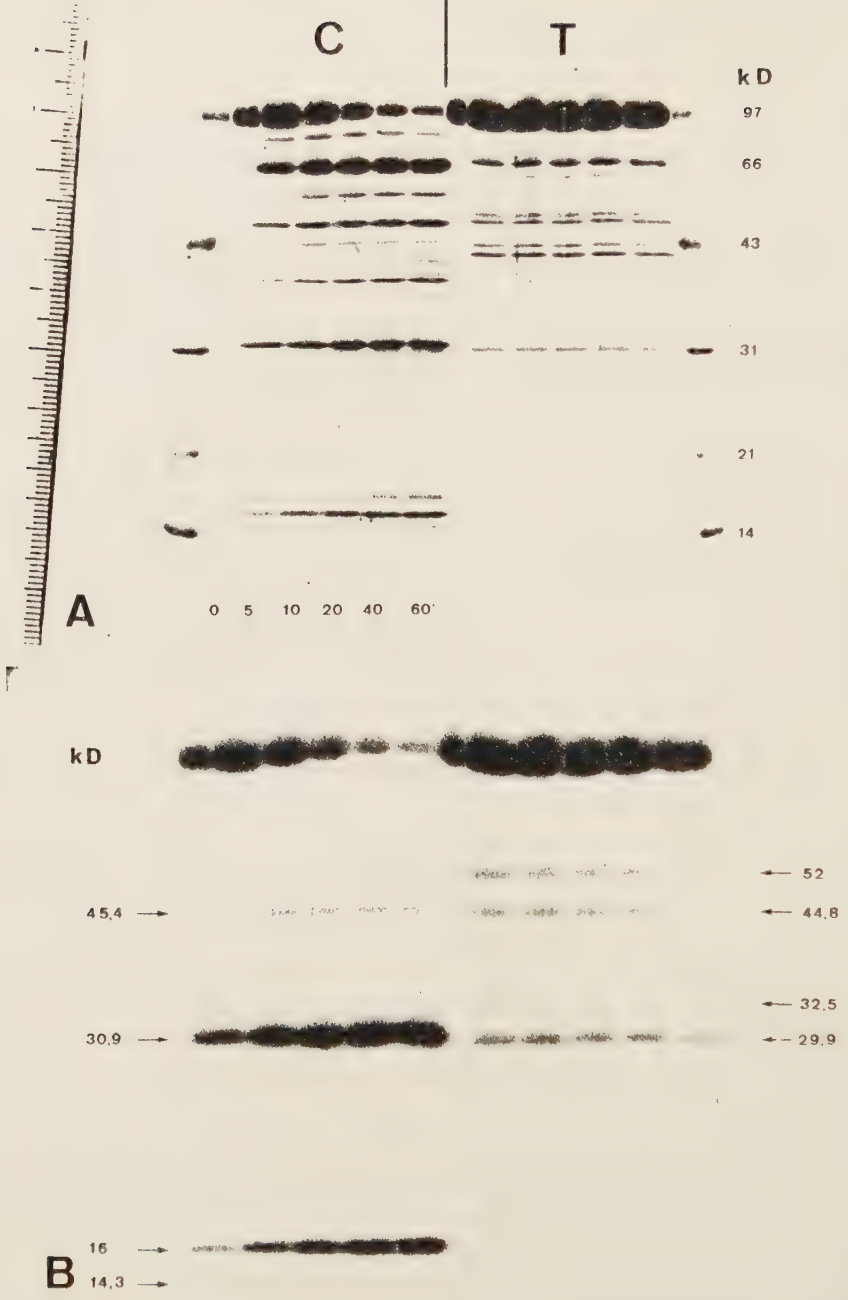


Abb. 28-33: SDS-gelelektrophoretische (und autoradiographische) Ana
lyse von Peptidmustern der gereinigten Phosphorylasen nach proteo
lytischer Verdauung durch Chymotrypsin und Trypsin. Es wurden Gra
dientengele mit 10 - 20 % Acrylamid (s. 2.9.1.) benutzt. Experimen
telle Bedingungen siehe 2.13.

Abb. 28: Kaninchenskelettmuskelphosphorylase a.
A: SDS-PAGE, B: Autoradiogramm

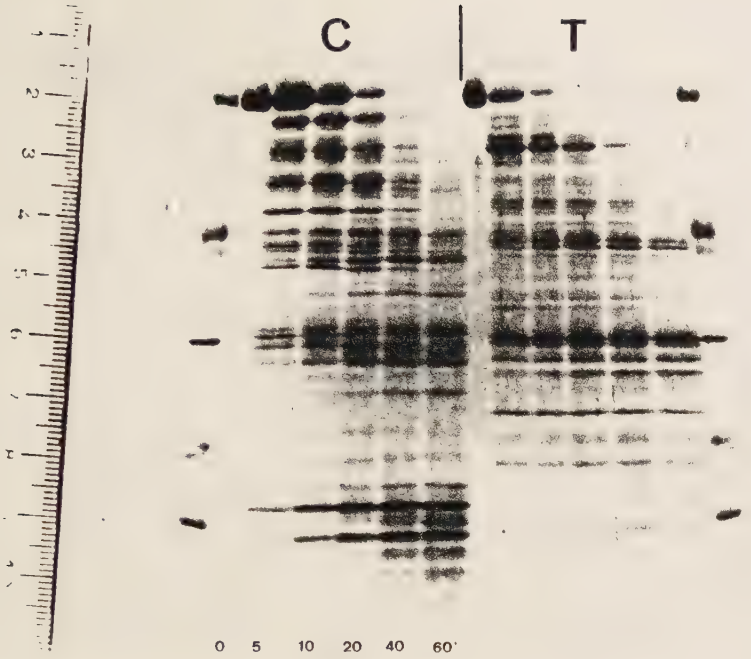


Abb. 29: Kaninchenskelettmuskelphosphorylase b, SDS-PAGE

Mit den diabetischen Phosphorylasen schien die Proteolyse langsamer abzulaufen. Die entstandenen Peptide stimmten zwar mit denen der Normalherzenzyme überein, es fehlten jedoch einige, die unter den gleichen Bedingungen mit den Kontrollherz-Phosphorylasen entstanden waren (Abb. 31).

TCA-lösliche Radioaktivität war in keinem Fall nachweisbar.

Phosphorylase b: Abb. 32 zeigt den zeitlichen Verlauf der Phosphorylase-b-Verdauung bei einem Enzym/Substrat-Verhältnis von 1:500. Wie bei der KSM-GP bot auch hier die b-Form den Proteasen mehr Angriffspunkte. Die Unterschiede zwischen den Typ-I- und -II-Isoenzymen traten deutlicher zutage.

Die diabetische GP-Ib war gegenüber beiden Proteasen resistenter als das Kontrollenzym, während die Phosphorylasen vom Typ II aus normalen und diabetischen Herzen gleichermaßen resistent gegen Proteolyse erschienen: Hier war nach 10 min keine Veränderung im Peptidmuster mehr feststellbar (Abb. 33).

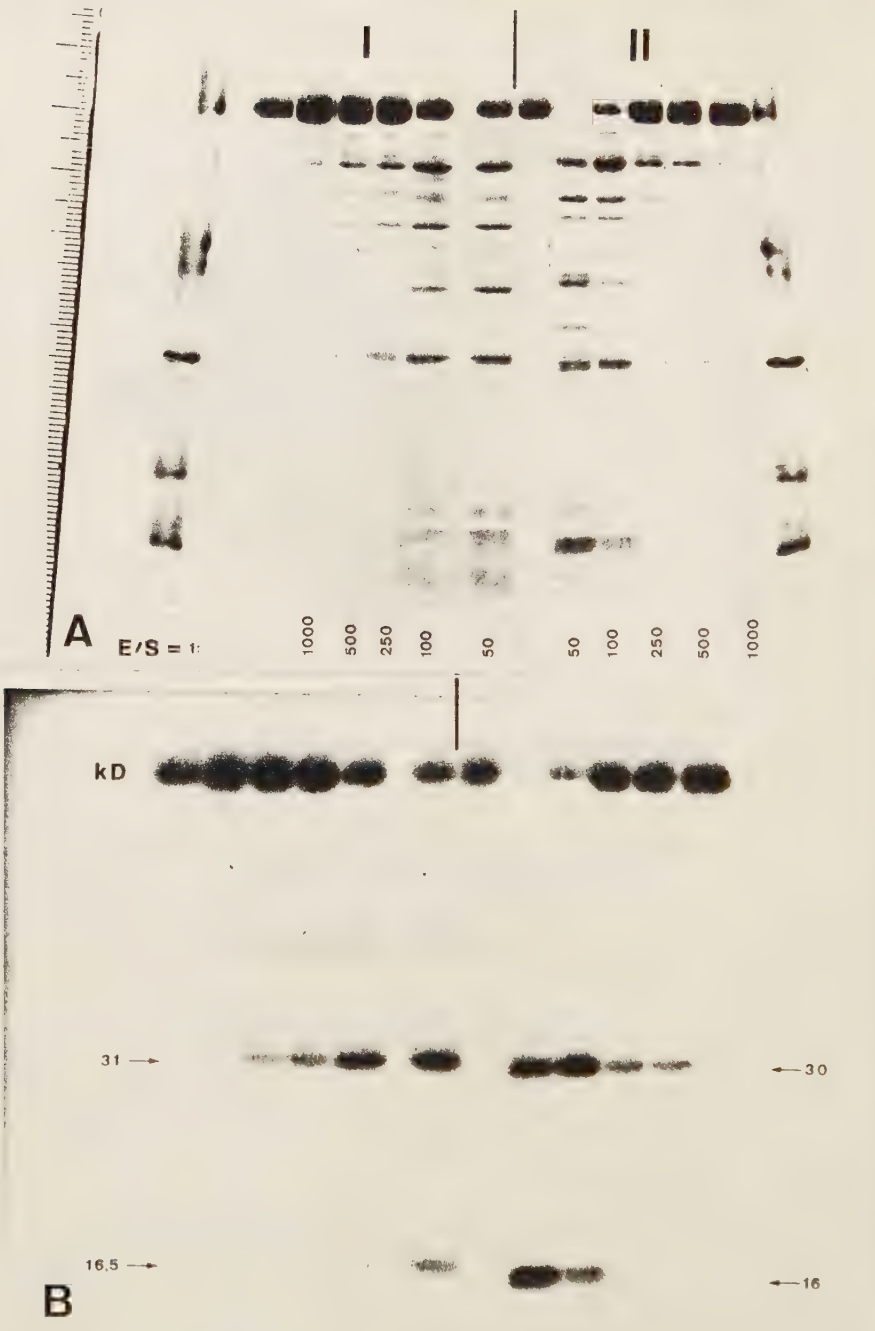
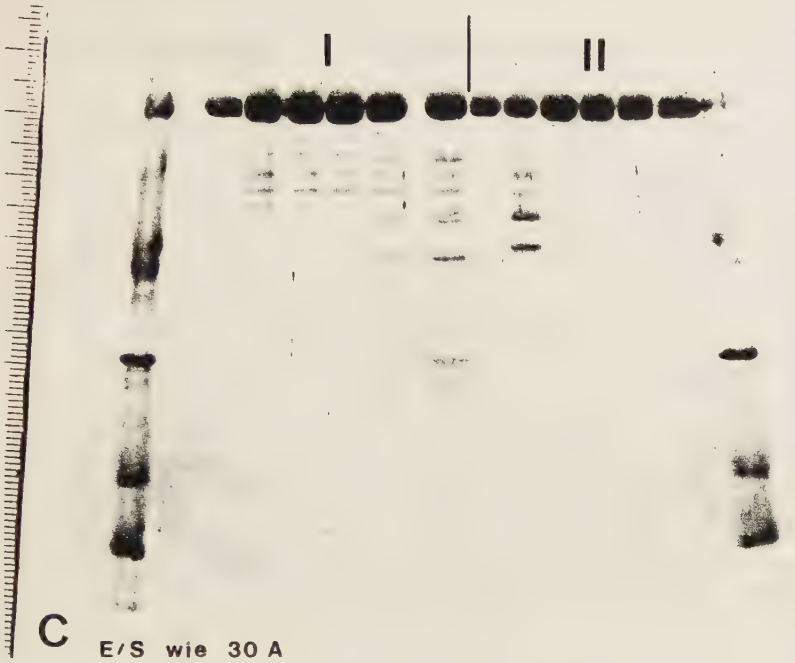
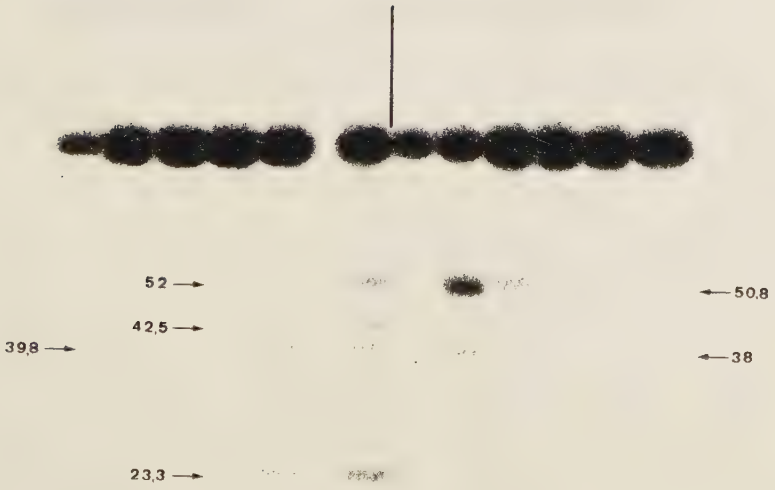


Abb. 30: Herzphosphorylasen Ia und IIa gesunder Ratten nach Inkuba
tion mit Chymotrypsin (A: SDS-PAGE, B: Autoradiogramm) bzw. Trypsi
(C: SDS-PAGE, D: Autoradiogramm)



C E/S wie 30 A



D

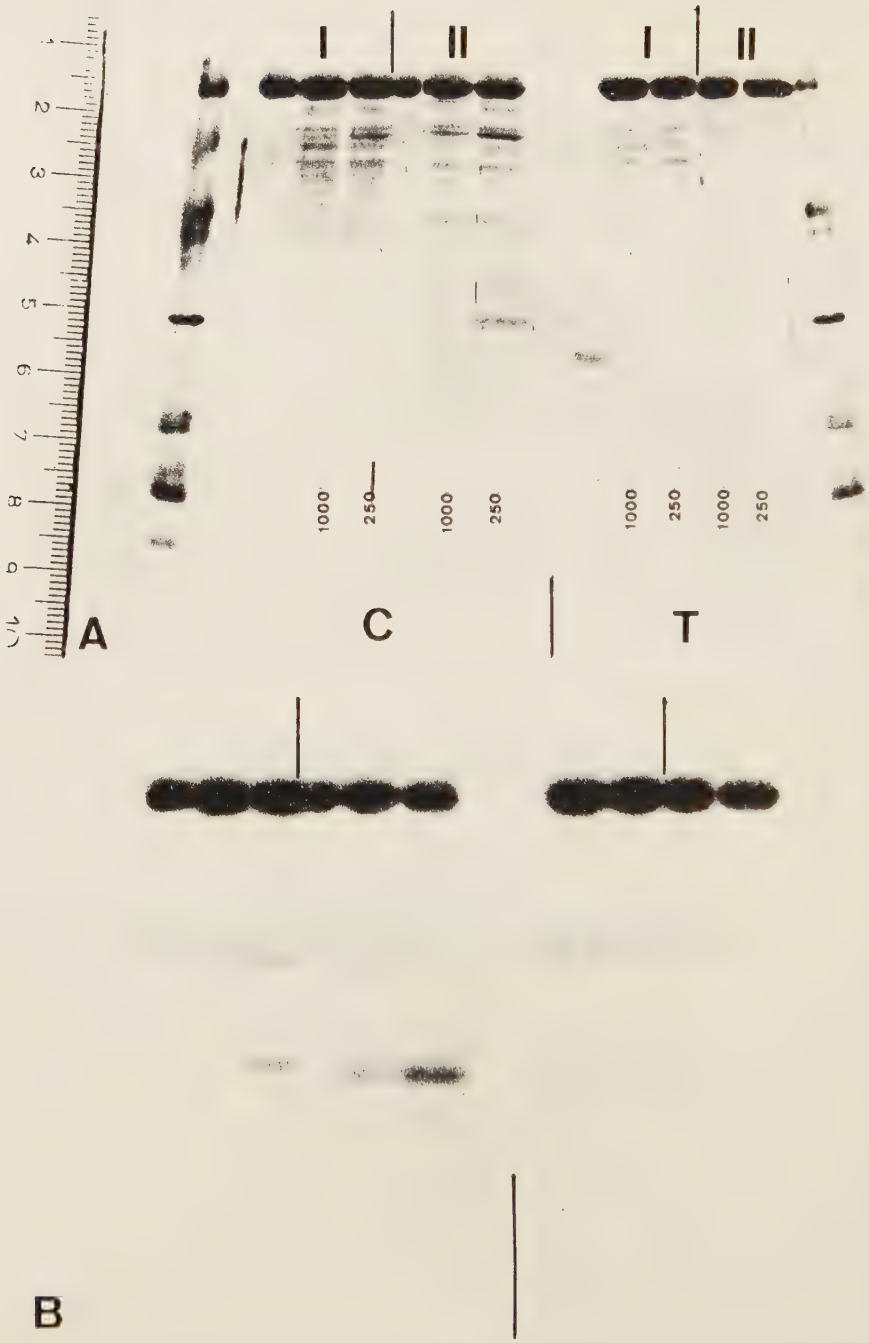


Abb. 31: Herzphosphorylasen Ia und IIa diabetischer Ratten nach Inkubation mit Chymotrypsin bzw. Trypsin (A: SDS-PAGE, B: Autoradiogramm)

3.8. Kinetische Eigenschaften

Frühere Untersuchungen hatten ergeben, daß GP-IIa nach Bindung an AMP-Sepharose 4B auch mit Glucose-6-phosphat von der Säule eluiert werden konnte, GP-Ia jedoch nur mit AMP (7). G6P gilt als allosterischer Inhibitor der Skelettmuskel-GPb, auf die phosphorylierte Form hat G6P keinen Einfluß mehr (6,106). Herzspezifische Isoenzyme werden dagegen auch in der a-Form von G6P gehemmt (6,107,108).

Dies war Anlaß, den Einfluß von G6P auf dephosphorylierte und phosphorylierte Formen der GP-I und -II quantitativ zu untersuchen. Die Aktivität wurde hierbei in Richtung Glycogensynthese (vgl. 2.8.1.) gemessen, da im gekoppelten optischen Test G6P Substrat eines der Hilfsenzyme (G6P-DH) ist. Wurde der Effekt von G6P auf die b-Formen der Isoenzyme gemessen, wurden dem Reaktionsmedium außerdem 100 uM AMP zugesetzt.
Abb. 34 zeigt, daß GP-I sich inbezug auf seine Wechselwirkung mit G6P wie ein skelettmuskeltypisches Enzym verhielt: Die Phosphorylierung entzog das Enzym der Kontrolle durch G6P. GP-IIb wurde von G6P stärker gehemmt als GP-Ib, und selbst in der a-Form wurde eine deutliche Hemmung festgestellt. Halbmaximale Hemmung war bei ca. 1.2 mM G6P erreicht, einer Konzentration, die im physiologischen Bereich liegt (108).

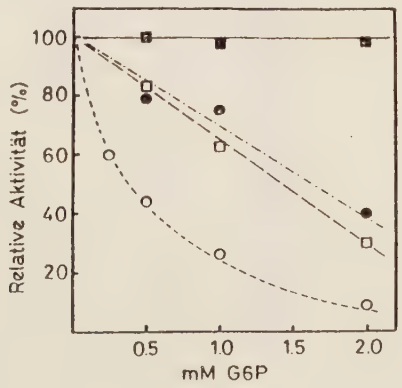


Abb. 34: Einfluß von Glucose-6-phosphat auf die Aktivität der cardialen Isoenzyme der Phosphorylase. (●) GP-Ib, (■) GP-Ia, (○) GP-IIb, (□) GP-IIa

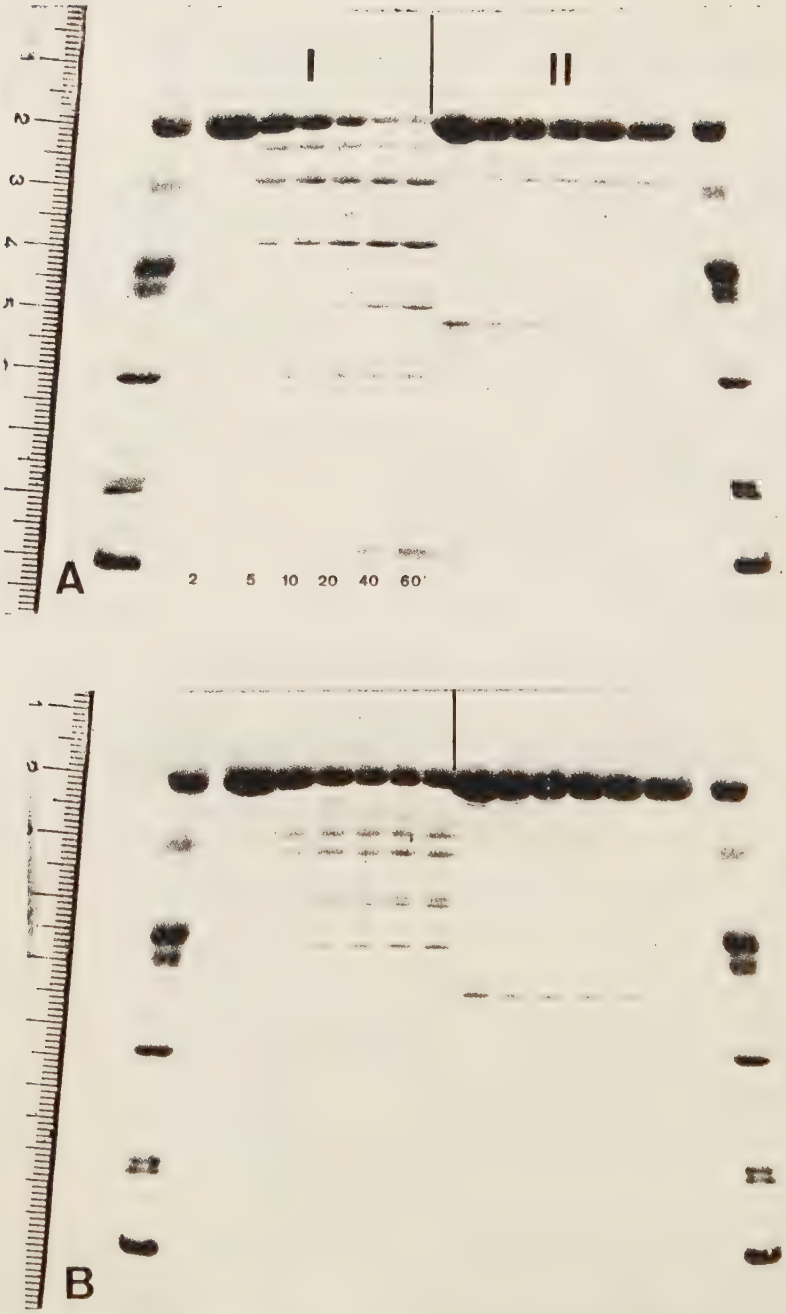


Abb. 32: Herzphosphorylasen Ib und IIb gesunder Ratten nach Inkubation mit Chymotrypsin (A) bzw. Trypsin (B): SDS-PAGE

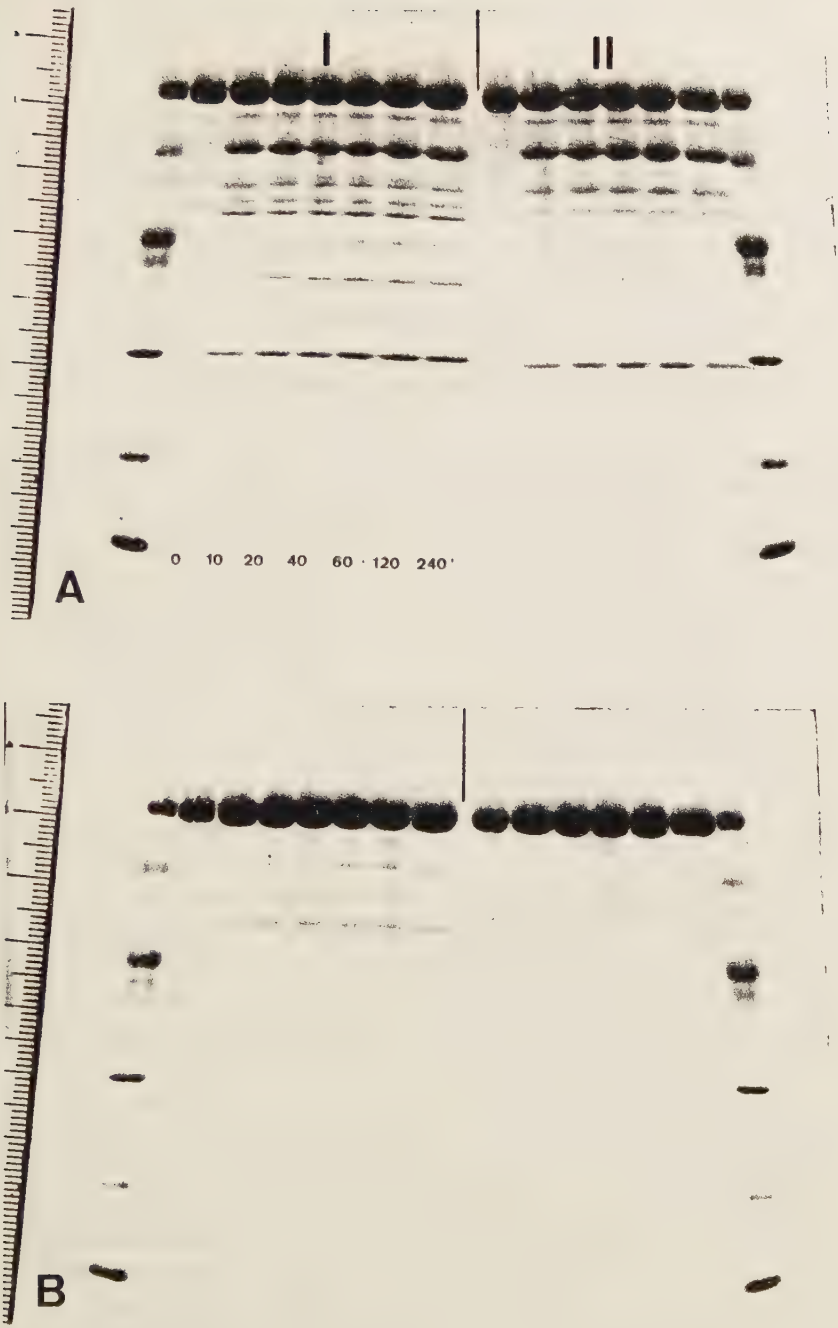


Abb. 33: Herzphosphorylasen Ib und IIb diabetischer Ratten nach Inkubation mit Chymotrypsin (A) bzw. Trypsin (B): SDS-PAGE

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene, wenn auch miteinander verwandte Themenkomplexe behandelt:

I Präparation und Charakterisierung einer Proteinphosphatase aus Kaninchenmuskel. Dieses Enzym wurde in möglichst reiner Form benötigt, um die in vitro-Dephosphorylierung der Rattenherzphosphorylasen stöchiometrisch und kinetisch zu untersuchen.

II Präparation und Charakterisierung der Phosphorylasen I und II aus Rattenherz sowie Untersuchungen vor allem im Hinblick auf die Frage, ob die beiden isolierten Formen reinigungsbedingte Artefakte oder native Isoenzyme darstellen.

III Isolierung der Phosphorylasen aus diabetischem Herzen und Untersuchungen zur Frage, ob diabetesinduzierte Veränderungen der Enzymmoleküle die bei dieser Stoffwechselstörung auftretende Glycogenanhäufung erklären können.

(I) Präparation und Charakterisierung der Proteinphosphatase-1

Enzymaktivitätsbestimmung: Die Proteinphosphatase-Aktivität kann mit Phosphorylase a als Substrat auf zwei verschiedene Weisen gemessen werden:

- durch die P_i-Freisetzung aus ^{32}P-markierter Phosphorylase a oder
- durch die bei der Reaktion erfolgende Inaktivierung, d.h. Überführung der a- in die b-Form (vgl. 2.8.1.).

Die erste Methode erfordert eine sorgfältige Präparation des Substratproteins sowie je nach Bedarf die wiederholte Markierung des Enzyms mit $^{32}P_i$. Die indirekte Messung ist dagegen mit kommerziell erhältlicher Phosphorylase a durchführbar. Ansonsten ist die radioaktive Methode dem indirekten Nachweis aus mehreren Gründen über-

legen:

- Das Reaktionsprodukt kann direkt gemessen und somit das Enzym als Proteinphosphatase identifiziert werden,
- die Substratkonzentration kann molar angegeben werden, weshalb auch die Enzymaktivität leicht in den üblichen Termini erfaßbar ist,
- Präzision, Empfindlichkeit und Schnelligkeit sind entschieden größer.

Deshalb wurde in dieser Arbeit die PP radioaktiv bestimmt.

Präparation: Um die in vitro-Regulation und Kinetik der Enzymdephosphorylierung zu analysieren, wird eine gereinigte Proteinphosphatase benötigt. Für diesen Zweck erschien es nicht vernünftig, große Gewebemengen zu verarbeiten, denn das Ziel war nicht, die PP selbst zu charakterisieren. Vielmehr sollte eine schnelle und praktische Methode entwickelt werden, um das Enzym in für den o.g. Zweck ausreichenden Mengen zu isolieren.

Die hier vorgestellte Methode erlaubte in etwa 3 Tagen aus 200 g Kaninchenmuskel ca. 0.81 mg elektrophoretisch nahezu homogenes Enzymprotein (s. Abb. 5, S.36) zu gewinnen. Dazu waren im wesentlichen drei chromatographische Schritte und eine ca. 28,000-fache Anreicherung erforderlich.

Eigenschaften: Das Molekulargewicht des gereinigten Enzyms betrug SDS-gelelektrophoretisch 35,9oo und gelchromatographisch 38,000. Da die katalytische Untereinheit der PP-2A ein ähnliches Molekulargewicht von 36,000 aufweist (109) und dieses Enzym ebenfalls die Dephosphorylierung der GP katalysiert (66), mußten weitere Experimente durchgeführt werden, um das gereinigte Enzym zu identifizieren (vgl. S. 29). Hierbei konnte man davon ausgehen, daß die von Cohen mit 1 und 2A bezeichneten Phosphatasen identisch sind mit den von Lee et al. beschriebenen PP C-I und C-II (68,1o9).
Da weder Inhibitorproteine der PP-1 noch eine ^{32}P-markierte Phosphorylasekinase zur Verfügung stand, wurde der Einfluß von Heparin, Mn^{2+} und Insulin auf die Aktivität der PP untersucht. In allen drei

Fällen stimmte das Verhalten des gereinigten Enzyms mit der PP-1 überein (Tab. 10), wodurch eine nahezu sichere Zuordnung möglich war.

Tabelle 10: Effekt verschiedener Substanzen auf die Aktivitäten von Proteinphosphatase-1 und -2A und die in dieser Arbeit beschriebenen Proteinphosphatase

Substanz	PP-1	PP-2A	Ref.	Diese Arbeit
Heparin	Inhibition	Kein Effekt	52	Inhibition
Manganionen	Inhibition	Aktivierung	68	Inhibition
Insulin	Kein Effekt	Aktivierung	77	Kein Effekt

Bei der Gelfiltration an Sephadex G-75 superfine wurde die Aktivität in zwei Peaks entsprechend den Molekulargewichten 60,000 und 38,000 eluiert. Da es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um Formen der PP-1 handelte - die Aktivitäten beider Peaks wurden von Mn^{2+} gehemmt -, wurden sie miteinander vereinigt und gemeinsam weiterverarbeitet. Möglicherweise stellt die höhermolekulare Form ein Aggregat zweier katalytischer Untereinheiten oder aber einen Komplex aus der katalytischen Untereinheit und inaktivem Inhibitor-2 (M_r=31,000) dar.

Die spezifische Aktivität des gereinigten Enzyms (ca. 9,000 Units/mg Protein) lag im unteren Bereich der erwarteten Größenordnung (vgl.S. 30). Lim-Tung et al. (70) beschrieben kürzlich eine Form der PP-1 mit M_r = 37,000 und einer spezifischen Aktivität von 15,000 Units/mg, die durch Inkubation mit Chymotrypsin in eine M_r=33,000-Form mit zweifach erhöhter Aktivität überführt werden kann. Diese Autoren konnten die M_r=37,000-Form nur isolieren, falls den Puffern Proteaseinhibitoren zugesetzt wurden. In dieser Arbeit wurde jedoch auch ohne die Verwendung von Proteaseinhibitoren nur eine PP-Form, näm-

lich mit einem M_r von 38,000 isoliert. Die Ursache für diese Diskrepanz ist unklar, möglicherweise jedoch darauf zurückzuführen, daß in dieser Arbeit in N_2 tiefgefrorenes und nicht frisches Muskelgewebe verwendet wurde. Ob diese proteolytische Aktivierung in vivo eine Rolle spielt, ist nicht bekannt.

Nach Cohen und Mitarbeitern liegt die intracelluläre PP-1-Konzentration bei ca. 0.5 uM (70). Anhand der Tabelle 1 betrug die für PP-1 berechnete Konzentration etwa 0.63 uM (unter der Annahme von 0.5 l Wasser pro kg Muskel). Die Phosphorylase-Konzentration im Kaninchenskelettmuskel beträgt, ausgehend von den Ergebnissen von Fischer & Krebs (35), etwa 60 uM, also etwa das Hundertfache der PP-1-Konzentration. Die in vivo-Konzentration der GP a beträgt also maximal das 15-fache des K_M-Wertes, je nachdem, wie groß der Anteil der GP a an der Gesamtmenge der GP ist. Falls die GP zu einem großen Teil aktiviert vorliegt, kann demnach die Dephosphorylierung mit maximaler Geschwindigkeit ablaufen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die in dieser Arbeit beschriebene gereinigte Proteinphosphatase in wesentlichen Eigenschaften mit der bereits bekannten Proteinphosphatase-1 übereinstimmt. Da die Proteinphosphatase-1 relativ viele Phosphoproteine als Substrat akzeptiert (66), ist das neu vorgestellte Reinigungsverfahren, das in kurzer Zeit die Präparation nahezu reiner PP-1 in ausreichenden Mengen erlaubt, besonders für Laboratorien interessant, die primär die Dephosphorylierung eines gegebenen Phosphoproteins untersuchen wollen.

(II) Eigenschaften der cardialen Phosphorylasen I und II

In der vorliegenden Arbeit wurde das früher entwickelte Reinigungsverfahren (7,36) weiterhin angewandt. Die Daten der Tabelle 3 zeigen, daß die Methode zuverlässige, d.h. reproduzierbare Ergebnisse liefert.

Wie das Kaninchen- (5) und Schweineherz (6) enthielt das Rattenherz zwei Phosphorylase-Formen, die sich in ihrer negativen Nettoladung voneinander unterschieden.
Jetzt konnte gezeigt werden, daß GP-I nach etwa 460-facher und GP-II nach etwa 1800-facher Anreicherung sowohl in der nativen als auch denaturierenden Gelelektrophorese und in der Gelfiltration sich wie homogene Proteine verhalten. Molekulargewicht (97,400) und Untereinheiten-Zusammensetzung (zwei identische Untereinheiten) beider Enzyme entsprachen der Kaninchenskelettmuskel-Phosphorylase. Die spezifischen Aktivitäten der Rattenherz-Phosphorylasen lagen mit 47.8 (GP-I) bzw. 46.3 Units/mg Protein (GP-II) jedoch um ca. 50 % höher als die der KSM-GP (s. S.28).

In vivo-Konzentration der cardialen Phosphorylasen. Eine Abschätzung der intracellulären GP-Konzentration (wie oben beschrieben) führt zu 6.8 uM GP-I und 2.0 uM GP-II (Monomer). Die Glycogenkonzentation,die früher mit 19.65 umol/g Frischgewicht (7) bestimmt wurde, beträgt nach derselben Abschätzung etwa 39 mM. Die molekulare Aktivität oder turnover number der beiden Phosphorylasen

$$k_{cat} = V_{max}/E_t$$

berechnete sich zu 9300/min (GP-I) und 9000/min (GP-II). Diese Werte liegen nur etwas niedriger als die turnover number der Phosphorylase aus Rattenskelettmuskel (10,000/min) (Tabelle 5). Da andererseits die Phosphorylasekonzentration im Skelettmuskel nach den Daten der Tabelle 5 etwa bei 177 uM in vivo liegt, kann man folgern, daß gemäß der oben angegebenen Gleichung der Substratumsatz pro GP-Molekül im Herzen wesentlich schneller erfolgt als im Skelettmuskel.

Abgrenzung der GP-I von der GP-II. Wie schon angedeutet, wurden mittels Ionenaustauschchromatographie zwei Proteinfraktionen mit GP-Aktivität isoliert. Der Peak, der bei niedrigerer Ionenstärke eluiert wurde, machte etwa 80 % der Gesamtaktivität aus.
Das Vorkommen herzspezifischer Isoenzyme ist in verschiedenen Säugern, nämlich Kaninchen (5,84), Schwein (6,83,84), Schaf (83,84),

Mensch (83,84) und Rind (84) mittels verschiedener, d.h. chromatographischer (5,6), elektrophoretischer (83) und immunologischer Methoden (84) nachgewiesen worden.
Bezüglich herzspezifischer Isoenzyme bei der Ratte sind bisher nur widersprüchliche Befunde beschrieben worden: Daß das Rattenherz zwei Arten von Phosphorylasen enthält, die möglicherweise Isoenzyme darstellen, stimmt mit den Ergebnissen von Sato et al. (85) überein, die in Rattenherzextrakten nach diskelektrophoretischer Auftrennung zwei Aktivitätsbanden nachgewiesen hatten. Auf der anderen Seite fanden in einer früheren Arbeit Davis et al. (83) nur eine GP-Bande in partiell gereinigten Herzextrakten. Diese Autoren hatten jedoch eine andere Färbetechnik benutzt als Sato et al. (85), sodaß diese Diskrepanz ihre Ursache schlicht in der unterschiedlichen Empfindlichkeit der Methoden haben könnte. Außerdem verwendeten sie Aktivkohle, um die Extrakte AMP-frei zu machen. Diese Methode ist nach eigenen Beobachtungen bei niedrigen GP-Konzentration, wie sie in Rattenherzextrakten üblicherweise herrschen, mit hohen Verlusten an Enzymaktivität verbunden, sodaß GP-II, deren Konzentration noch niedriger liegt, vermutlich verloren worden war.
1977 fanden Vereb et al. (84), daß Immunotitration der Rattenherz-Phosphorylase mit Antikörpern gegen Kaninchenskelettmuskel-Phosphorylase zu einer totalen Hemmung der Aktivität führt, was ebenfalls nicht auf das Vorkommen einer herzspezifischen Form hinweist.

Diese widersprüchlichen Resultate ließen es notwendig erscheinen, näher zu untersuchen, ob die beiden isolierten Formen präparationsbedingte Artefakte darstellen.
In Kenntnis der Eigenschaften von Muskel-Phosphorylase-Isoenzymen mußten mindestens drei Möglichkeiten in Betracht gezogen werden, um das Typ-II-Enzym zu identifizieren:

1) Das als II bezeichnete Enzym ist in Wirklichkeit eine sog. GP b', d.h. ein GP-Molekül, das durch Proteolyse ein Oligopeptid mit der phosphorylierbaren Aminosäure verloren hat (53) (s.S.80), das der intakten GP b jedoch insofern gleicht, als es in Gegenwart von AMP aktiv ist (64).
2) "II b" ist schon partiell phosphoryliert, was zu einer erhöhten

negativen Nettoladung führen und somit die Elution von einem Anionenaustauschgel bei höheren Ionenstärken erklären würde.

3) "II b" ist ein intaktes GP-Molekül, für das die Bezeichnung Isoenzym zutrifft.

Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich in der Zusammenschau nur im Sinne der dritten Hypothese interpretieren.

Daß die Elution einer zweiten GP-Form ein herzspezifisches Phänomen darstellt, folgte aus der Tatsache, daß bei Chromatographie der GP aus Rattenskelettmuskel nach derselben Methode nur ein Enzym an der Stelle des Herz-Isoenzyms I eluiert wurde. Schafantikörper gegen Rattenskelettmuskel-GP zeigten keinerlei Kreuzreaktion mit der cardialen GP-II, wohl aber mit GP-I. Auf dem Boden dieses Ergebnisses spricht der Befund von Vereb et al. (84) gegen die Spezifität des von diesen Autoren verwendeten Antikörpers. Drittens ließen sich in Übereinstimmung mit Sato et al. (85) auch in einem Herzrohextrakt, der keinerlei Manipulationen unterzogen wurde, mehrere Phosphorylase-Formen nachweisen, von denen zwei mit den isoelektrischen Punkten der gereinigten GP-Ib und GP-IIb übereinstimmten. Dieser Befund spricht, da zwischen dem Nachweis mehrerer GP-Formen im Rohextrakt und der Untersuchung der gereinigten Proteine vier Manipulationen liegen, ebenfalls für die Intaktheit und Stabilität der untersuchten Enzyme.

Gleichwohl entkräften die bis dahin beschriebenen Befunde nicht völlig die ersten beiden Hypothesen (s.o.), da, falls sie zutreffen sollten, damit Konformationsänderungen des Proteins einhergehen können, die z.B. die immunologische Nichtidentität hervorrufen könnten. Die Phosphorylierungsexperimente jedoch zeigten, daß keines der beiden Enzyme Produkt einer limitierten Proteolyse oder bereits partiell phosphoryliert ist. Vielmehr unterstützen diese Ergebnisse, daß beide Enzyme pro Untereinheit je 1 Molekül Phosphat inkorporieren, parallel hierzu vollständig aktiviert werden und somit native Isoenzyme darstellen, die der Regulation durch kovalente Modifikation unterliegen.

Aus der Tatsache, daß die Spaltpeptidmuster nach Verdauung mit verschiedenen Proteasen ungleich waren, folgt, daß GP-I und GP-II Pro

teine mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz sind und wahrscheinlich von verschiedenen Genen codiert werden.

Physiologische Rolle der GP-II. Übereinstimmend für alle bisher beschriebenen herzspezifischen Phosphorylasen fand man, daß diese eine höhere Affinität zu Glycogen (110), ihrem allosterischen Aktivator AMP (6,106-108) und ihrem allosterischen Inhibitor Glucose-6-phosphat (6,107,108) haben. G6P inhibiert nur die b-Form der Skelettmuskel-GP, nicht aber die a-Form, wie es bei den cardialen Isoenzymen beobachtet wird (6,106). Die herzspezifischen Phosphorylasen des Kaninchens und des Schweins werden zudem vier- bis fünfmal langsamer dephosphoryliert als die entsprechenden Isoenzyme des Skelettmuskels (111).

Die Phosphorylase-II aus Rattenherz teilt mit den bisher beschriebenen herzspezifischen Phosphorylasen die Eigenschaften einer höheren Affinität zu Glycogen und AMP (7,36). In dieser Arbeit wurde nun der Effekt von G6P auf die verschiedenen Formen der Rattenherz-GP untersucht, zudem Vorversuche ergeben hatten, daß an AMP-Sepharose gebundene GP-IIa im Gegensatz zur GP-Ia mit G6P eluiert werden konnte. Die Ergebnisse zeigten, daß die Wechselwirkung zwischen GP-I und G6P dem für das Skelettmuskel-Isoenzym typische Verhalten entspricht. GP-II dagegen wurde selbst in der phosphorylierten Form in ihrer Aktivität von G6P gehemmt und glich damit den bisher beschriebenen cardialen Isoenzymen anderer Säuger. Ebenso wie diese wurde auch GP-II wesentlich langsamer dephosphoryliert als GP-I.
Die hier durchgeführten strukturellen und funktionellen Untersuchungen ergaben somit mehrere Hinweise dafür, daß Phosphorylase-II ein herzspezifisches Isoenzym der Ratte darstellt.

Was die biologische Rolle eines herzspezifischen Isoenzyms angeht, ist von Vereb & Bot (6,107,108) vorgeschlagen worden, daß dieses wegen seiner höheren Empfindlichkeit für AMP selbst in der b-Form in der Lage ist, unter hypoxischen Bedingungen, wenn (ATP) und (G6P) fallen, die (AMP) jedoch ansteigt, den Glycogenabbau zu katalysieren. Im Gegensatz zur Skelettmuskel-GP bleibt die Herz-GP auch nach

Phosphorylierung unter der allosterischen Kontrolle von G6P, was eine feiner abgestufte Regulation der Aktivität ermöglicht. Vermutlich verhindert dieser Mechanismus, daß das cardiale Glycogen, dessen Konzentration sehr viel niedriger ist als im Skelettmuskel, völlig abgebaut wird.

Falls es allgemein zutrifft, daß herzspezifische Phosphorylasen, wie in dieser Arbeit für das Rattenherz nachgewiesen, von einem anderen Gen kontrolliert werden als das Skelettmuskel-Isoenzym, ergibt sich die folgende interessante Frage: Wie wird das Verhältnis zwischen cardialem und muskulären Isoenzym im Herzen, das in den bekannten Fällen zwischen 22 und 62 % schwankt (84), d.h. die Expression der beiden Gene reguliert? Möglicherweise spielen hier Alter, Trainingsgrad, Vorgeschichte und Ernährungszustand o.ä. eine Rolle. Das Vorhandensein zweier Gene würde jedenfalls prinzipiell die Möglichkeit eröffnen, das quantitative Verhältnis der beiden Isoenzyme zueinander den Erfordernissen anzupassen.

(III) Phosphorylasen aus diabetischem Rattenherzen

Verminderte Phosphorylasemenge im diabetischen Herzen. Die Präparation der Phosphorylase aus diabetischem Herzen nach derselben Methode führte ebenfalls zur Isolation zweier Formen, die sich in ihrer Elutionsposition bei der Ionenaustauschchromatographie nicht von den Enzymen aus gesundem Herzen unterschieden. In Reinheitsgrad, spezifischer Aktivität, ihrem Mengenverhältnis zueinander, Quartärstruktur und Molekulargewicht glichen die Isoenzyme des diabetischen Herzens ihren normalen Gegenstücken.

Beim Vergleich der beiden Reinigungsprotokolle (Tabelle 3 und 4) fällt jedoch auf, daß der Proteingehalt pro Fraktion auf jeder Ebene der Präparation gegenüber der Kontrolle erniedrigt war; dasselbe galt für die Gesamtaktivität pro Fraktion. Während der Proteingehalt pro Fraktion beim diabetischen Tier konstant um 50 % des Kontrollwertes lag, nahm die Aktivität gegenüber der Kontrollpräparation

stark ab. Nach Abschluß der Präparation lagen Protein und Aktivität bei ca. 50 % der Kontrolle, sodaß konsequenterweise die spezifische Aktivität im selben Bereich lag. Die geringere Phosphorylasemenge pro Gewichtseinheit und die um 50 % erniedrigte Ausbeute weisen im Zusammenhang mit der Tatsache, daß die gereinigten Enzyme die gleiche spezifische Aktivität besaßen, darauf hin, daß die diabetischen Phosphorylasen eine Strukturänderung durchgemacht haben, die ihre Instabilität oder aber den Abbau durch Proteasen erhöht, ihre katalytische Funktion jedoch kaum beeinträchtigt.

Williams et al. (112), Dahlmann et al. (113), Chua et al. (114) sowie Pain et al. (115) fanden infolge eines experimentellen Diabetes im Herzen sowohl eine verminderte Proteinsynthese- als auch eine erhöhte Proteinabbaurate und dementsprechend einen erniedrigten Proteingehalt. Im Zusammenhang mit diesen Befunden ist die verminderte GP-Ausbeute wohl eher auf exogene Einflüsse zurückzuführen und nicht auf eine verminderte Stabilität der Phosphorylase selbst.

Bahnak & Gold (116), die Glycogensynthase aus gesunden und diabetischen Rattenlebern reinigten, fanden ebenfalls eine deutlich verminderte Ausbeute bei den diabetischen Tieren und sahen hierin zumindest eine Ursache für den in der diabetischen Leber wesentlich erniedrigten Glycogengehalt. Diese Interpretation wurde wenig später durch eine Arbeit von Akatsuka et al. (117) gestützt, da hiernach die GS aus diabetischer Leber eine dreifach niedrigere Affinität zu ihrem Aktivator G6P besitzt und durch die Proteinphosphatase wesentlich langsamer aktiviert wird. Als Ursache dieser Störungen wurden diabetesinduzierte Konformations- bzw. Strukturänderungen des Enzyms diskutiert. Der Verlust des Leberglycogens ist somit wahrscheinlich auf eine Inhibition des synthetisierenden Systems zurückzuführen und nicht - was ebenfalls denkbar wäre - auf eine Aktivierung der Glycogenolyse. Vielmehr sind sämtliche Enzyme der glycogenolytischen Kaskade in der diabetischen Leber ebenfalls erniedrigt (23). Diese Veränderungen sind wohl als Folge des Glycogenmangels und somit eher im Sinne einer Gegenregulation aufzufassen.

Wechselwirkung zwischen Phosphorylasen und Phosphorylasekinase bzw. Proteinphosphatase-1. Die Glycogenakkumulation, die im diabetischen Herzen beobachtet wird (7,24,25), kann ihre Ursache in einer Aktivierung der Synthese und/oder einer Inhibition der Glycogenolyse haben. Wie schon in der Einleitung erörtert, haben eigene Voruntersuchungen (7) und die Befunde von Miller (20,118) erwartungsgemäß ergeben, daß der Insulinmangel zu einer Verminderung der GSa führt. Da andererseits die Enzyme der glycogenolytischen Kaskade im Diabetes basal unverändert sind (7,20,119), kommt der Wechselwirkung zwischen der GP und ihren Kontrollenzymen eine besondere Bedeutung zu. Nach den hier erhobenen Befunden ist diese Wechselwirkung im diabetischen Herzen in dem oben postulierten Sinne gestört: Unter Bedingungen einer Kinetik nullter sowie erster Ordnung wurden die Isoenzyme aus diabetischem Herzen langsamer aktiviert, jedoch schneller inaktiviert. Auffällig hierbei war, daß sich die Geschwindigkeiten der P_i-Inkorporation bzw. -Freisetzung nicht änderten, was ein weiterer Hinweis dafür ist, daß die durch die (De)Phosphorylierung bewirkte Konformationsänderung eine andere Region des Proteins betrifft als die Phosphorylierungsstelle. Im folgenden sollen die methodischen, enzymologischen und physiologischen Aspekte bzw. Konsequenzen dieses Resultats diskutiert werden.

Methodologie. Abgesehen davon, daß das Ergebnis mit einer zweiten unabhängigen Präparation bestätigt werden konnte, sprechen folgende Betrachtungen für die Richtigkeit der Befunde.
Zum einen waren Proteinkonzentration und dementsprechend auch die Aktivitäten der GP nahezu gleich, weshalb, ohne der Gefahr einer Fehlinterpretation zu unterliegen, die relative Größe -/+ AMP als Parameter benutzt werden konnte. Diese Methode hat den Vorzug, unvermeidbare Verdünnungs- und Pipettierfehler bei der Durchführung des optischen GP-Tests auszuschalten.
Obwohl alle Versuche, die zu einem direkten Vergleich herangezogen wurden, am selben Tage in Parallelansätzen durchgeführt wurden, wäre als weitere Fehlermöglichkeit eine von Ansatz zu Ansatz verschiedene Konzentration der GPK bzw. PP-1 denkbar. Daß dies nicht zutraf, ging aus der überall gleichen Autophosphorylierung der GPK und der nahezu

identischen P_i-Freisetzungsrate hervor.
Als einzige weitere Fehlerquelle bliebe dann noch eine unentdeckte Kontamination einer der Enzympräparationen mit Nucleotiden, insbesondere AMP, dessen hemmende Wirkung auf die Phosphorylierung und Dephosphorylierung bekannt ist (vgl. Abb. 9, S.38). Eine unentdeckte oder größere AMP-Kontamination der Präparation N-I im Vergleich zur Präparation D-I hätte beispielsweise folgende Konsequenzen: P_i-Inkorporation, Aktivierung, P_i-Freisetzung und Inaktivierung verliefen bei N-I langsamer als bei D-I. Außer der letzten war keine dieser notwendigen Bedingungen erfüllt. Eine ähnliche Betrachtung für den umgekehrten Fall (größerer AMP-Gehalt der Präparation D-I) führt ebenfalls zu dem Schluß, daß diese angenommene Fehlerquelle ausscheidet.

Enzymologie und Physiologie. Es wird allgemein akzeptiert, daß Phosphorylierung die Aktivierung der Phosphorylase auslöst. Im Falle der GP, die durch Einbau eines Phosphatmoleküls vollständig aktiviert wird, würde man dementsprechend für die Funktion Relative Aktivität der a-Form A = f (P_i-Gehalt) den einfachen Verlauf A = 0 + 1 P_i postulieren. Tatsächlich lagen jedoch sämtliche Meßpunkte für N-I und N-II oberhalb dieser gedachten Linie (vgl. Abb. 24) und wiesen auf einen eher hyperbolischen Verlauf hin. Dies würde bedeuten, daß die intramolekulare Signalumwandlung Phosphorylierung = Aktivierung initial sehr schnell und allmählich immer langsamer erfolgte. Eventuell spielt hier eine negative Kooperativität zwischen den Untereinheiten eine Rolle; eine experimentelle Bestätigung dieses Gedankens ist jedoch erschwert, da die beiden Untereinheiten identisch sind und deshalb nicht einfach zu entscheiden ist, ob die beiden Untereinheiten simultan oder sequentiell (wie cardiale Phosphorylasekinase (120)) phosphoryliert werden.
Die beiden Isoenzyme aus diabetischem Herzen scheinen in ihrer Konformation so verändert zu sein, daß die Phosphorylierung verzögert in eine Aktivierung, die Dephosphorylierung beschleunigt in eine Inaktivierung umgesetzt wird (vgl. Abb. 24). Falls dies auch in vivo zutrifft, nähme die Kapazität der ohnehin verminderten Gesamtmenge an Phosphorylase, den Glycogenabbau zu katalysieren, zusätzlich ab.

Dieser Befund würde den drastisch vermehrten Glycogengehalt diabetischer Herzzellen zumindest teilweise erklären. Als Ursache hierfür kommt ein Aminosäureaustausch - vielleicht verursacht durch fehlerhaftes RNA-Processing - oder, noch wahrscheinlicher, posttranslationelle Modifikation(en) in Betracht. Ein solcher Vorgang kann nach Vergleich der Spaltpeptidmuster der diabetischen und der normalen Isoenzyme nicht sicher ausgeschlossen werden. Dieser Verdacht könnte überprüft werden, indem man als Enzymquelle chronisch-diabetische Herzen benutzt, da man in diesem Fall einen vollständigen Austausch aller Phosphorylasemoleküle erwarten darf.

Die gestörte Wechselwirkung der diabetischen Isoenzyme mit ihren Kontrollenzymen steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu den Befunden von Miller (20,118,119) und Vadlamudi & McNeill (121), die im diabetischen Herzen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen eine im Vergleich zum gesunden Herzen verstärkte Phosphorylase-Aktivierung in Reaktion auf ß-Agonisten (Adrenalin, Isoproterenol) und Glucagon beobachtet hatten, obwohl basal cAMP und die Proteinkinase-Aktivität nicht verändert oder nach Ingebretsen et al. (122) in Reaktion auf Adrenalin sogar vermindert ist. Verantwortlich für die trotzdem überproportionale GP-Aktivierung ist nach beiden Autoren der im Diabetes adrenalinabhängig erhöhte Ca^{2+}-Einstrom (123), wodurch die Phosphorylasekinase cAMP-unabhängig aktiviert werden kann (124). Ein solcher Mechanismus schließt die in dieser Arbeit geschilderten Beobachtungen keinesfalls aus.

Zusammenfassend liegen, durch Insulinmangel verursacht, folgende erhebliche Störungen der cardialen Glycogenphosphorylase vor:

- Die Affinität zu Glycogen ist wesentlich geringer (7).
- Die Gesamtmenge an Enzym ist, wahrscheinlich aufgrund verminderter Synthese und/oder erhöhter Proteolyse, vermindert.
- Die Interkonversionsreaktionen sind insofern beeinträchtigt, als die Aktivierung verlangsamt und die Inaktivierung beschleunigt erfolgt. Daß dieser Störung eine diabetesinduzierte Veränderung des Phosphorylaseproteins zugrundeliegt, geht daraus hervor, daß die

Enzyme aus gesundem Herzen sowohl für die GPK als auch die PP-1 ein "besseres" Substrat darstellten als deren natürliches Substrat Kaninchenskelettmuskel-GP, während die diabetischen Phosphorylasen für die PP-1 ein noch besseres, für die GPK dagegen ein "schlechteres" Substrat waren.

Alle drei Veränderungen sind insofern gleichsinnig, als sie die katalytische Funktion der Phosphorylase beeinträchtigen und somit zu einer im steady state erhöhten Glycogenkonzentration führen können. Als Ursache hierfür muß auch die im diabetischen Herzen erhöhte Konzentration an G6P (24,25) diskutiert werden, da dies die phosphorylierte (inaktive) Glycogensynthase b aktiviert (46) und, wie diese Arbeit ergab, die herzspezifische Phosphorylase-IIa hemmt. Ob dieser Mechanismus allerdings allein verantwortlich für die abnorm hohe Glycogenkonzentration ist, muß nach den hier vorgelegten Ergebnissen bezweifelt werden. Wahrscheinlich wird die Regulation des Glycogenstoffwechsels im diabetischen Herzen sowohl durch metabolische Einflüsse als auch Störungen auf Proteinebene beeinträchtigt.

5. Zusammenfassung

Anlaß für die vorliegende Arbeit waren die folgenden Beobachtungen:

1) Bei Präparation der Phosphorylase aus Rattenherz werden ionenaustauschchromatographisch zwei Aktivitätsgipfel (GP-I und GP-II) eluiert.
2) Das diabetische Herz akkumuliert in vivo Glycogen, obwohl die Glycogensynthase-Aktivität im Insulinmangel erniedrigt ist.

Somit hatte diese Arbeit zwei Schwerpunkte. Zum einen wurden Untersuchungen durchgeführt, die klären sollten, ob die beiden Phosphorylase-Formen native Isoenzyme darstellen. Zum zweiten wurde insbesondere die Regulation der Phosphorylase aus diabetischen Herzen durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung analysiert.

1) Es wurde ein reproduzierbares Reinigungsverfahren für cardiale Phosphorylase, bestehend aus Ammoniumsulfatfällung, Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie, entwickelt. Elektrophoretisch und gelchromatographisch war das Protein homogen.Die spezifische Aktivität der GP-I betrug 47.8, die der GP-II 46.3 units/mg Protein bei einer Gesamtausbeute von 50.7 %. GP-II machte 22 % der Gesamtaktivität aus.

Bei Präparation der Phosphorylase aus Rattenskelettmuskel nach demselben Verfahren erschien bei Chromatographie an DEAE-Sepharose nur ein Peak an der Position der cardialen GP-I. Antikörper gegen Skelettmuskelphosphorylase reagierten nur mit GP-I, nicht aber mit GP-II. Beide Phosphorylase-Formen konnten nach isoelektrischer Fokussierung eines Herzrohextraktes mittels Aktivitätsanfärbung nachgewiesen werden.

Beide Isoenzyme bestehen aus zwei identischen Untereinheiten mit M$_r$ 97,400. Das pH- und Temperatur-Optimum betrug übereinstimmend 6.8 bzw. 40 °C. Im physiologischen Temperaturbereich wies GP-II jedoch eine deutlich niedrigere Aktivierungsenergie auf.

Beide Enzyme ließen sich mit Hilfe der Phosphorylasekinase und Mg-ATP in die a-Form überführen. Dabei wurde pro Untereinheit 1 Molekül P_i inkorporiert. In der phosphorylierten Form zeichnete sich GP-II durch eine Neigung zur Tetramerbildung aus. Vermutlich deshalb war die Dephosphoryliefungsgeschwindigkeit der GP-II nur halb so groß wie bei GP-I, da Proteinphosphatase nur dimere Phosphorylase als Substrat akzeptiert. Tryptische und chymotryptische Spaltpeptidmuster der Phosphorylase-I und Phosphorylase-II waren verschieden voneinander.

Im Vergleich zu Phosphorylase-I zeichnete sich Phosphorylase-II durch eine wesentlich höhere Sensitivität gegenüber ihrem Aktivator AMP und ihrem Inhibitor Glucose-6-phosphat und eine geringere Dephosphorylierungsgeschwindigkeit aus. Insofern stimmt sie mit herzspezifischen Isophosphorylasen anderer Säugetiere überein.

Diese Versuche ließen den Schluß zu, daß es sich bei der Isolierung zweier Formen keineswegs um einen Präparationsartefakt, sondern vielmehr um Isoenzyme handelt, die wahrscheinlich von verschiedenen Genen exprimiert werden.

2) Bis zur Homogenität gereinigte Phosphorylasen aus diabetischen Herzen wiesen dieselbe spezifische Aktivität auf wie die Kontrollenzyme. Die Ausgangsaktivität war jedoch um ein Viertel und die Gesamtausbeute um etwa die Hälfte gegenüber den Kontrollpräparationen vermindert.

In Molekulargewicht, Untereinheitenstruktur und isoelektrischen Punkten unterschieden sich die Phosphorylase-Isoenzyme aus diabetischen Herzen nicht von der Kontrolle.

Die Wechselwirkung zwischen den Phosphorylasen und den modifizierenden Enzymen war allerdings gestört: Grad und Geschwindigkeit des P_i-Einbaus waren zwar unverändert, der damit verbundene Aktivierungsprozess war jedoch deutlich verlangsamt. Das umgekehrte gilt für die Dephosphorylierungsreaktion: Wiederum war die Geschwindigkeit der

P_i-Freisetzung unverändert gegenüber der Kontrolle, die Inaktivierung jedoch beschleunigt. Die Unterschiede zwischen diabetischen und gesunden Tieren persistierten unter verschiedenen kinetischen Bedingungen und auch bei Verwendung von AMP, einem potenten Inhibitor der Phosphorylase-Dephosphorylierung. Diese Resultate konnten mit einer zweiten Enzympräparation sowohl der Phosphorylase als auch der Kinase bzw. Phosphatase reproduziert werden.

Diese Effekte beruhen vermutlich auf strukturellen oder konformativen Veränderungen der Phosphorylase im diabetischen Herzen, deren Ursache bzw. Natur vorerst ungeklärt bleibt. Ein eindeutig verschiedenes Peptide Mapping, was auf einen Aminosäureaustausch hinweisen würde, ließ sich nicht ausschließen. Immerhin könnte neben der ohnehin verminderten Enzymmenge der bei gleichem Phosphatgehalt verringerte Aktivierungsgrad der diabetischen Phosphorylase eine Ursache für die im Insulinmangel beobachtete Glycogenakkumulation sein.

6. Literaturverzeichnis

1 Green,A.A. & G.T.Cori: Crystalline Muscle Phosphorylase: I. Preparation, Properties and Molecular Weight
J. Biol. Chem. 151, 21-29 (1943)

2 Cori,G.T. & A.A.Green: Crystalline Muscle Phosphorylase: II. Prosthetic Group
J. Biol. Chem. 151, 31-38 (1943)

3 Sutherland,E.W. & W.D.Wosilait: Inactivation and Activation of Liver Phosphorylase
Nature 175, 169-170 (1955)

4 Fischer,E.H. & E.G.Krebs: Conversion of Phosphorylase b to Phosphorylase a in Muscle Extracts
J. Biol. Chem. 216, 121-132 (1955)

5 Yunis,A.A., E.H.Fischer & E.G.Krebs: Comparative Studies on Glycogen Phosphorylase: IV. Purification and Properties of Rabbit Heart Phosphorylase
J. Biol. Chem. 237, 2809-2815 (1962)

6 Vereb,G. & G.Bot: The Allosteric Properties of the Isoenzymes of Pig Heart Phosphorylase
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 7, 35-46 (1972)

7 Berndt,N.: Glycogenstoffwechsel im Herzmuskel diabetischer Ratten
Diplomarbeit Universität Düsseldorf, November 1982

8 Sutherland,E.W. & T.W.Rall: The Properties of an Adenine Ribonucleotide Produced with Cellular Particles, ATP, Mg^{2+}, and Epinephrine or Glucagon
J. Am. Chem. Soc. 79, 3608 (1957)

9 Krebs,E.G., D.J. Graves & E.H.Fischer: Factors Affecting the Activity of Muscle Phosphorylase b Kinase
J. Biol. Chem. 234, 2867-2873 (1959)

10 Krebs,E.G. & E.H.Fischer: Molecular Properties and Transformations of Glycogen Phosphorylase in Animal Tissues
Adv. Enzymol. 24, 263-290 (1962)

11 Walsh,D.A., J.P.Perkins & E.G.Krebs: An Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent Protein Kinase from Rabbit Skeletal Muscle
J. Biol. Chem. 243, 3763-3765 (1968)

12 Killilea,S.D., H.Brandt & E.Y.C.Lee: Modulation of Protein Function by Protein Phosphorylation: The Role of Protein Phosphatases
TIBS 1, 30-33 (1976)

13 Cohen,P.: The Role of Protein Phosphorylation in the Hormonal Control of Enzyme Activity
Eur. J. Biochem. 151, 439-448 (1985)

14 Fain,J.N.: Insulin Secretion and Action
Metabolism 33, 672-679 (1984)

15 Friedman,D.L. & J.Larner: Studies on UDPG-a-glucan Transglucosylase: III. Interconversion of Two Forms of Muscle UDPG-a-glucan Transglucosylase by a Phosphorylation-dephosphorylation Reaction Sequence
Biochemistry 2, 669-675 (1963)

16 Gold,A.H.: The Effect of Diabetes and Insulin on Liver Glycogen Synthetase Activation
J. Biol. Chem. 245, 903-905 (1970)

17 Van de Werve,G., W.Stalmans & H.G.Hers: The Effect of Insulin on the Glycogenolytic Cascade and on the Activity of Glycogen Synthase in the Liver of Anaesthetized Rabbits
Biochem. J. 162, 143-146 (1977)

18 Chang,L.Y. & L.C.Huang: Effects of Insulin Treatment on the Activities of Phosphoprotein Phosphatase and its Inhibitors
Acta Endocrinol. 95, 427-432 (1980)

19 Adolfsson,S., O.Isaksson & A.Hjalmarson: Effect of Insulin on Glycogen Synthesis and Synthetase Enzyme Activity in the Perfused Rat Heart
Biochim. Biophys. Acta 279, 146-156 (1972)

20 Miller, T.B.: A Dual Role for Insulin in the Regulation of Cardiac Glycogen Synthase
J. Biol. Chem. 253, 5389-5394 (1978)

21 Witters,L. & J.Avruch: Insulin Regulation of Hepatic Glycogen Synthase and Phosphorylase
Biochemistry 17, 406-410 (1978)

22 Cohen,P., P.J.Parker & J.R.Woodgett: The Molecular Mechanism by which Insulin Activates Glycogen Synthase in Mammalian Skeletal Muscle
In: Molecular Basis of Insulin Action, ed. M.P.Czech, Plenum Publishing Corporation 1985

23 Khandelwal,R.J., S.M.Zinman & E.J.Zebrowski: The Effect of Streptozotocin-induced Diabetes and of Insulin Supplementation on Glycogen Metabolism in Rat Liver
Biochem. J. 168, 541-548 (1977)

24 Rösen,P.: Wechselwirkungen zwischen Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel im Herzmuskel der diabetischen Ratte.
Habilitationsschrift Universität Düsseldorf, 1983

25 Chen,V., C.D.Ianuzzo, B.C.Fong & J.Spitzer: The Effects of Acute and Chronic Diabetes on Myocardial Metabolism in Rats
Diabetes 33, 1078-1084 (1984)

26 Miller,T.B., M.Pradeiro, C.Wolleben & J.Bullman: A Hypersensitivity of Glycogen Phosphorylase Activation in Hearts of Diabetic Rats
J. Biol. Chem. 256, 1748-1753 (1981)

27 Huang,F.L. & W.H.Glinsmann: Separation and Characterization of Two Phosphorylase Phosphatase Inhibitors from Rabbit Skeletal Muscle
Eur. J. Biochem. 70, 419-426 (1976)

28 Foulkes,J.G. & P.Cohen: The Hormonal Control of Glycogen Metabolism: Phosphorylation of Protein Phosphatase Inhibitor-1 in vivo in Response to Adrenaline
Eur. J. Biochem. 97, 251-256 (1979)

29 Foulkes,J.G., L.S.Jefferson & P.Cohen: The Hormonal Control of Glycogen Metabolism: Dephosphorylation of Protein Phosphatase Inhibitor-1 in vivo in Response to Insulin
FEBS Lett. 112, 21-24 (1980)

30 Ingebritsen,T.S., A.A.Stewart & P.Cohen: The Protein Phosphatases Involved in Cellular Regulation: 6. Measurement of Type-1 and Type-2 Protein Phosphatases in Extracts from Mammalian Tissues: an Assessment of their Physiological Roles
Eur. J. Biochem. 132, 297-307 (1983)

31 Goris,J., F.Dopere, J.R.Vandenheede & W.Merlevede: Regulation of Liver Phosphorylase Phosphatase: ATP-Mg-mediated Activation of the Partially Purified Dog-liver Enzyme
FEBS Lett. 117, 117-121 (1980)

32 Hemmings,B.A., D.Yellowlees, J.C.Kernohan & P.Cohen: Purification of Glycogen Synthase Kinase-3 from Rabbit Skeletal Muscle
Eur. J. Biochem. 119, 443-451 (1981)

33 Krebs,E.G. & J.A.Beavo: Phosphorylation-Dephosphorylation of Enzymes
Ann. Rev. Biochem. 48, 923-959 (1979)

34 Cohen,P.: The Subunit Structure of Rabbit Skeletal Muscle Phosphorylase Kinase, and the Molecular Basis of its Activation Reactions
Eur. J. Biochem. 34, 1-14 (1973)

35 Fischer,E.H. & E.G.Krebs: The Isolation and Crystallization of Rabbit Skeletal Muscle Phosphorylase b
J. Biol. Chem. 231, 65-71 (1958)

36 Berndt,N. & P.Rösen: Isolation and Partial Characterization of Two Forms of Rat Heart Glycogen Phosphorylase
Arch. Biochem. Biophys. 228, 143-154 (1984)

37 Gergely,P., F.Erdödi & G.Bot: Heparin Inhibits the Activity of Protein Phosphatase-1
FEBS Lett. 169, 45-48 (1984)

38 Antoniw,J.F., H.G.Nimmo, S.J.Yeaman & P.Cohen: Comparison of the Substrate Specificities of Protein Phosphatases Involved in the Regulation of Glycogen Metabolism in Rabbit Skeletal Muscle
Biochem. J. 162, 423-433 (1977)

39 Bradford,M.M.: A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding
Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)

40 Cohen,P., J.C.Saari & E.H.Fischer: Comparative Study of Dogfish and Rabbit Muscle Phosphorylases
Biochemistry 12, 5232-5241 (1973)

41 Bergmeyer,H.U., K.Gawehn & M.Grassl: Phosphorylase a
In: Methoden der enzymatischen Analyse I, Hg. H.U.Bergmeyer, 539-541, Verlag Chemie 1974

42 Helmreich,E. & C.F.Cori: The Role of Adenylic Acid in the Activation of Phosphorylase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51, 131-138 (1964)

43 Maddaiah,V.T. & N.B.Madsen: Kinetics of Purified Liver Phosphorylase
J. Biol. Chem. 241, 3873-3881 (1966)

44 Gilboe,D.P., K.L.Larson & F.Q.Nuttall: Radioactive Method for the Assay of Glycogen Phosphorylases
Anal. Biochem. 47, 20-27 (1972)

45 Thomas,J.A., K.K.Schlender & J.Larner: A Rapid Filter Paper Assay for UDP Glucose-Glycogen Glucosyltransferase, Including an Improved Biosynthesis of UDP-^{14}C-glucose
Anal. Biochem. 25, 486-499 (1968)

46 Villar-Palasi,C. & J.Larner: Insulin-mediated Effect on the Activity of UDPG-Glycogen Transglucosylase of Muscle
Biochim. Biophys. Acta 39, 171-173 (1960)

47 Gill,G.N. & G.M.Walton: Assay of Cyclic Nucleotide-dependent Protein Kinases
Adv. Cycl. Nucl. Res. 10, 93-106 (1979)

48 Corbin,J.D., P.H.Sugden, L.West, D.A.Flockhart, T.M.Lincoln & D. McCarthy: Studies on the Properties and Mode of Action of the Purified Regulatory Subunit of Bovine Heart Adenosine 3',5'-Monophosphate-dependent Protein Kinase
J. Biol. Chem. 253, 3997-4003 (1978)

49 Posner,J.B., R.Stern & E.G.Krebs: Effects of Electrical Stimulation and Epinephrine on Muscle Phosphorylase, Phosphorylase b Kinase and Adenosine 3',5'-Phosphate
J. Biol. Chem. 240, 982-985 (1965)

50 Foulkes,J.G. & P.Cohen: The Regulation of Glycogen Metabolism: Purification and Properties of Protein Phosphatase Inhibitor-2 from Rabbit Skeletal Muscle
Eur. J. Biochem. 105, 195-203 (1980)

51 Stewart,A.A., B.A.Hemmings, P.Cohen, J.Goris & W.Merlevede: The MgATP-dependent Protein Phosphatase and Protein Phosphatase-1 Have Identical Substrate Specificities
Eur. J. Biochem. 115, 197-205 (1981)

52 Pelech,S. & P.Cohen: The Protein Phosphatases Involved in Cellular Regulation: 1. Modulation of Protein Phosphatases-1 and -2A by Histone H1, Protamine, Polylysine and Heparin
Eur. J. Biochem. 148, 245-251 (1985)

53 Fischer,E.H., D.J.Graves, E.R.Snyder-Crittenden & E.G.Krebs: Structure of the Site Phosphorylated in the Phosphorylase b to a Reaction
J. Biol. Chem. 234, 1698-1704 (1959)

54 Antoniw,J.F. & P.Cohen: Separation of Two Phosphorylase Kinase Phosphatases from Rabbit Skeletal Muscle
Eur. J. Biochem. 68, 45-54 (1976)

55 Chua, N.-H.: Electrophoretic Analysis of Chloroplast Proteins
Meth. Enzymol. 69, 434-446 (1980)

56 Switzer,R.C., C.R.Merril & S.Shifrin: A Highly Sensitive Silver Stain for Detecting Proteins and Peptides in Polyacrylamide Gels
Anal. Biochem. 98, 231-237 (1979)

57 Rothe,G.M. & H.Purkhanbaba: Determination of Molecular Weights and Stokes' Radii of Non-denatured Proteins by Polyacrylamide Gradient Gel Electrophoresis: 1. An Equation Relating Total Polymer Concentration, the Molecular Weight of Proteins in the Range of 10^4 - 10^5, and Duration of Electrophoresis
Electrophoresis 3, 33-42 (1982)

58 Rothe,G.M. & H.Purkhanbaba: ... 2. Determination of the Size of Stable and Labile Molecular Weight Variants of Enzymes from Plant Sources
Electrophoresis 3, 43-48 (1982)

59 Rothe,G.M.: Applicability of the log MM - D Relationship to Linear Polyacrylamide Gradient Gel Electrophoresis under a Wide Range of Experimental Conditions
Electrophoresis 3, 255-262 (1982)

60 Vesterberg,O., L.Hansen & A.Sjösten: Staining of Proteins after Isoelectric Focusing in Gels by New Procedures
Biochim. Biophys. Acta 491, 160-166 (1977)

61 Ouchterlony,O.: Antigen-Antibody Reactions in Gels
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 26, 507-515 (1949)

62 Kreyszig,E.: Testverteilungen - Testen von Hypothesen - Entscheidungen
In: Statistische Methoden und ihre Anwendungen. Vandenhoeck & Ruprecht 1968

63 Segel,I.H.: Kinetics of Unireactant Enzymes
In: I.H.Segel, Enzyme Kinetics, John Wiley & Sons, New York 1975

64 Krebs,E.G., A.B.Kent & E.H.Fischer: The Muscle Phosphorylase b Kinase Reaction
J. Biol. Chem. 231, 73-83 (1958)

65 Cori,G.T. & C.F.Cori: The Enzymatic Conversion of Phosphorylase a to b
J. Biol. Chem. 158, 321-332 (1945)

66 Ingebritsen,T.S. & P.Cohen: The Protein Phosphatases Involved in Cellular Regulation: 1. Classification and Substrate Specificity
Eur. J. Biochem. 132, 255-261 (1983)

67 Ingebritsen,T.S., J.G.Foulkes & P.Cohen: The Protein Phosphatases Involved in Cellular Regulation: 2. Glycogen Metabolism
Eur. J. Biochem. 132, 263-274 (1983)

68 Silberman,S.R., M.Spelh, R.Nemani, M.K.Ganapathi, V.Dombradi, H. Paris & E.Y.C.Lee: Isolation and Characterization of Rabbit Skeletal Muscle Protein Phosphatases C-I and C-II
J. Biol. Chem. 259, 2913-2923 (1984)

69 Resink, T.J., B.A.Hemmings, H.Y.Lim-Tung & P.Cohen: Characterization of a Reconstituted Mg-ATP-dependent Protein Phosphatase
Eur. J. Biochem. 133, 455-461 (1983)

70 Lim-Tung,H.Y., T.J.Resink, B.A.Hemmings, S.Shenolikar & P.Cohen: The Catalytic Subunits of Protein Phosphatase-1 and Protein Phosphatase-2A are Distinct Gene Products
Eur. J. Biochem. 138, 635-641 (1984)

71 Stralfors,P., A.Hiraga & P.Cohen: The Protein Phosphatases Involved in Cellular Regulation: Purification and Characterization of the Glycogen-bound Form of Protein Phosphatase-1 from Rabbit Skeletal Muscle
Eur. J. Biochem. 149, 295-303 (1985)

72 Ballou,L.M., D.L.Brautigan & E.H.Fischer: Subunit Structure and Activation of Inactive Phosphorylase Phosphatase
Biochemistry 22, 3393-3399 (1983)

73 Brautigan,D.L., C.L.Shriner & P.A.Gruppuso: Phosphorylase Phosphatase Catalytic Subunit: Evidence that the M_r=33,000 Enzyme Fragment Is Derived from a Native Protein of M_r=75,000
J. Biol. Chem. 260, 4295-4302 (1985)

74 Shenolikar,S. & T.S.Ingebritsen: Protein (Serine and Threonine) Phosphate Phosphatases
Meth. Enzymol. 107, 102-130 (1984)

75 Tonks,N.K. & P.Cohen: The Protein Phosphatases Involved in Cellular Regulation: Identification of the Inhibitor-2 Phosphatases in Rabbit Skeletal Muscle
Eur. J. Biochem. 145, 65-70 (1984)

76 Merril,C.R., D.Goldman & M.L.Van Keuren: Gel Protein Stains: Silver Stain
Meth. Enzymol. 104, 441-446 (1984)

77 Speth,M. & E.Y.C.Lee: A Novel in vitro Interaction of Insulin with Rabbit Skeletal Muscle Protein Phosphatases
J. Biol. Chem. 259, 4027-4030 (1984)

78 Bot,G. & I.Dosa: The Influence of Effectors Modifying Phosphorylase a in the Phosphorylase Phosphatase Reaction
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 6, 73-87 (1971)

79 Nolan,C., W.B.Novoa, E.G.Krebs & E.H.Fischer: Further Studies on the Site Phosphorylated in the Phosphorylase b to a Reaction
Biochemistry 3, 542-551 (1964)

80 Martensen,T.M., J.E.Brotherton & D.J.Graves: Kinetic Studies of the Activation of Muscle Phosphorylase Phosphatase
J. Biol. Chem. 248, 8329-8336 (1973)

81 Martensen,T.M., J.E.Brotherton & D.J.Graves: Kinetic Studies of the Inhibition of Muscle Phosphorylase Phosphatase
J. Biol. Chem. 248, 8323-8328 (1973)

82 Bot,G., E.Kovacs & P.Gergely: Role of Tetramer-Dimer Equilibrium in the Dephosphorylation and Activity of Phosphorylase a
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 12, 335-341 (1977)

83 Davis,C.H., L.H.Schliselfeld, D.P.Wolf, C.A.Leavitt & E.G.Krebs: Interrelationships among Glycogen Phosphorylase Isoenzymes
J. Biol. Chem. 242, 4824-4833 (1967)

84 Vereb,G., P.Gergely & G.Bot: Studies on Heart Isophosphorylases by Means of Immunotitration
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 12, 237-244 (1977)

85 Sato,K., K.Satoh, S.Sato, F.Imai & H.P.Morris: Isozyme Patterns of Glycogen Phosphorylase in Rat Tissues and Transplantable Hepatomas
Cancer Res. 36, 487-495 (1976)

86 Segel,I.H.: Effects of Temperature on Enzyme Activity
In: I.H.Segel, Enzyme Kinetics, John Wiley & Sons, New York 1975

87 Titani,K., A.Koide, J.Hermann, L.H.Ericsson, S.Kumar, R.D.Wade, K.A.Walsh, H.Neurath & E.H.Fischer: Complete Amino Acid Sequence of Rabbit Muscle Glycogen Phosphorylase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4762-4766 (1977)

88 Lambin,P., D.Rochu & J.M.Fine: A New Method for Determination of Molecular Weights of Proteins by Electrophoresis across a Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) - Polyacrylamide Gradient Gel
Anal. Biochem. 74, 567-575 (1976)

89 Krebs,E.G.: Phosphorylation and Dephosphorylation of Glycogen Phosphorylase: A Prototype for Reversible Covalent Enzyme Modification
Curr. Top. Cell. Regul. 18, 401-419 (1981)

90 Krebs,E.G.: The Phosphorylation of Proteins: A Major Mechanism for Biological Regulation
Biochem. Soc. Trans. 13, 813-820 (1985)

91 Hiken,J.F. & J.C.Lawrence,jr.: Rat Skeletal Muscle Glycogen Synthase: Phosphorylation of the Purified Enzyme by cAMP-Dependent and -Independent Protein Kinases
Arch. Biochem. Biophys. 236, 59-71 (1985)

92 Ramachandran,C., K.L.Angelos, S.Sivarama-Krishnan & D.A.Walsh: Regulation of Cardiac Glycogen Synthase
Federation Proc. 42, 9-13 (1983)

93 Akatsuka,A., T.J.Singh & K.-P.Huang: Phosphorylation of Rat Liver Glycogen Synthase Bound to the Glycogen Particle
Arch. Biochem. Biophys. 235, 186-195 (1984)

94 Imazu,M., W.G.Strickland, T.D.Chrisman & J.H.Exton: Phosphorylation and Inactivation of Liver Glycogen Synthase by Liver Protein Kinases
J. Biol. Chem. 259, 1813-1821 (1984)

95 Sevilla,C.L. & E.H.Fischer: The Purification and Properties of Rat Muscle Glycogen Phosphorylase
Biochemistry 8, 2161-2171 (1969)

96 DeVincenzi,D.L. & J.L.Hedrick: Re-Evaluation of the Molecular Weights of Glycogen Phosphorylases a and b Using Sephadex Gel Filtration
Biochemistry 6, 3489-3497 (1967)

97 Seery,V.L., E.H.Fischer & D.C.Teller: A Reinvestigation of the Molecular Weight of Glycogen Phosphorylase
Biochemistry 6, 3315-3327 (1967)

98 Metzger,B., E.Helmreich & L.Glaser: The Mechanism of Activation of Skeletal Muscle Phosphorylase a by Glycogen
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 57, 994-1001 (1967)

99 Huang,C.Y. & D.J.Graves: Correlation between Subunit Interactions and Enzymatic Activity of Phosphorylase a: Method for Determining Equilibrium Constants from Initial Rate Measurements
Biochemistry 9, 660-671 (1970)

100 Bailey,J.M. & W.J.Whelan: The Roles of Glucose and AMP in Regulating the Conversion of Phosphorylase a into Phosphorylase b
Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 191-197 (1972)

101 Bot,G. & P.Gergely: Formation of Tetramer Phosphorylase a in vivo
FEBS Lett. 24, 7-10 (1972)

102 Foulkes,J.G. & L.S.Jefferson: Protein Phosphatase-1 and -2A Activities in Heart, Liver, and Skeletal Muscle Extracts from Control and Diabetic Rats
Diabetes 33, 576-579 (1984)

103 Bot,G., E.Polyik & P.Gergely: The Tryptic Digestion of Phosphorylase a and b
Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 8, 219-229 (1973)

104 Carney,I.T., R.J.Beynon, J.Kay & N.Birkett: The Susceptibility of Muscle Phosphorylases a and b to Digestion by a Neutral Proteinase from Rat Intestinal Muscle
Biochem. J. 175, 105-113 (1978)

105 Cleveland,D.W., S.G.Fischer, M.W.Kirschner & U.K.Laemmli: Peptide Mapping by Limited Proteolysis in Sodium Dodecyl Sulfate and Analysis by Gel Electrophoresis
J. Biol.Chem. 252, 1102-1106 (1977)

106 Schliselfeld,L.H., C.H.Davis & E.G.Krebs: A Comparison of Phosphorylase Isozymes in the Rabbit
Biochemistry 9, 4959-4965 (1970)

107 Vereb,G. & G.Bot: Regulation of Heart Specific Phosphorylase a by AMP, Glucose 6-phosphate and Glucose
Int.J.Biochem. 10, 697-703 (1979)

108 Vereb,G., K.Szücs & G.Bot: Ligand Effects on the Activity of the a Form of Various Mammalian Heart Specific Isophosphorylases
Int.J.Biochem. 14, 1013-1017 (1982)

109 Lim-Tung,H.Y., S.Alemany & P.Cohen: The Protein Phosphatases Involved in Cellular Regulation: 2. Purification, Subunit Structure and Properties of Protein Phosphatases-$2A_0$, -$2A_1$ and -$2A_2$ from Rabbit Skeletal Muscle
Eur.J.Biochem. 148, 253-263 (1985)

110 Will,H., E.-G.Krause, M.Böhm, H.Guski & A.Wollenberger: Kinetische Eigenschaften der Isoenzyme der Glycogenphosphorylase b aus Herz- und Skelettmuskulatur des Menschen
Acta biol.med.germ. 33, 149-160 (1974)

111 Szücs,K., G.Vereb & G.Bot: Ligand Effects on the Dephosphorylation of Heart and Skeletal Muscle Specific Phosphorylases
Int. J. Biochem. 15, 1161-1167 (1983)

112 Williams,I.H., B.H.L.Chua, R.H.Sahms, D.Siehl & H.E.Morgan: Effects of Diabetes on Protein Turnover in Cardiac Muscle
Am.J.Physiol. 239, E178-E185 (1980)

113 Dahlmann,B., H.Metzinger & H.Reinauer: Studies on Proteolytic Activities in Heart Muscle of Diabetic Rats
Diabete et Metabolisme 2, 129-135 (1982)

114 Chua,B.H.L., W.M.Long, N.Lautensack, J.A.Lins & H.E.Morgan: Effects of Diabetes in Cardiac Lysosomes and Protein Degradation
Am.J.Physiol. 245, C91-C100 (1983)

115 Pain,V.M., E.C.Albertse & P.J.Garlick: Protein Metabolism in Skeletal Muscle, Diaphragm, and Heart of Diabetic Rats
Am.J.Physiol. 245, E604-E610 (1983)

116 Bahnak,B.R. & A.H.Gold: Isolation and Characterization of Liver Glycogen Synthase from Diabetic Rats
Arch.Biochem.Biophys. 213, 492-503 (1982)

117 Akatsuka,A., T.J.Singh & K.P.Huang: Comparison of the Liver Glycogen Synthase from Normal and Streptozotocin-induced Diabetic Rats
Arch.Biochem.Biophys. 220, 426-434 (1983)

118 Miller,T.B.: Altered Regulation of Cardiac Glycogen Metabolism in Spontaneously Diabetic Rats
Am.J.Physiol. 245, E379-E383 (1983)

119 Miller,T.B.: Phosphorylase Activation Hypersensitivity in Hearts of Diabetic Rats
Am.J.Physiol. 246, E134-E140 (1984)

120 Sul,H.S., R.H.Cooper, S.Whitehouse & D.A.Walsh: Cardiac Phosphorylase Kinase: Modulation of the Activity by cAMP-dependent and cAMP-independent Phosphorylation of the a'-Subunit
J.Biol.Chem. 257, 3484-3490 (1982)

121 Vadlamudi,R.V.S.V. & J.H.McNeill: Effect of Experimental Diabetes on Rat Cardiac cAMP, Phosphorylase, and Inotropy
Am.J.Physiol. 244, H844-H851 (1983)

122 Ingebretsen,W.R.jr., C.Peralta, M.Monsher, L.K.Wagner & C.G.Ingebretsen: Diabetes Alters the Myocardial cAMP-Protein Kinase Cascade System
Am.J.Physiol. 240, H375-H382 (1981)

123 Goetzsche,O.: Abnormal Calcium Uptake in Response to Isoproterenol in Experimental Diabetes
Diabetologia 21, 276-281 (1981)

124 Drummond,G.I., L.Duncan & A.J.D.Friesen: Some Properties of Cardiac Phosphorylase b Kinase
J.Biol.Chem. 240, 2778-2785 (1965)

D a n k s a g u n g

Bei der Anfertigung dieser Arbeit bin ich von verschiedener Seite unterstützt worden.

Ich danke Herrn H.P. Neubauer (Hoechst AG, Frankfurt am Main) für die Produktion von Schaf-Antiserum gegen Rattenskelettmuskel-Phosphorylase und Herrn Prof. Dr. L. Heilmeyer (Ruhr-Universität Bochum) für die Überlassung von gereinigter Phosphorylasekinase.

Herrn. Prof. Dr. Hans Reinauer danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes sowie die stete Förderung der Arbeit.

Ich danke Frau Jutta Feuerstein, Frau Monika Adrian sowie Herrn Torsten Goesch für die Mithilfe bei Tierexperimenten und kinetischen Messungen.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Dr. Burkhard Dahlmann, Herrn Dr. Malte Rutschmann und Frau Ingrid Bahner für hilfreiche Diskussionen, praktische Anregungen und manche Aufmunterung.

Insbesondere danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. Peter Rösen für die Bereitstellung des Themas, seine engagierte Betreuung der Arbeit und viele anregende Diskussionen.

L e b e n s l a u f

22.12.1953	geboren in Düsseldorf
1960-1964	Brehmschule Düsseldorf
1964-1969	Kopernikusschule Langenfeld
1969-1972	Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium Hilden mit Abschluß Abitur
1973-1974	Militärdienst in Munster/Niedersachsen
1975-1982	Studium der Biologie an der Universität Düsseldorf
Juli 1981	Mündliche Diplom-Hauptprüfung mit dem Hauptfach Physiologische Chemie und den Nebenfächern Pflanzenphysiologie und Anorganische Chemie
1981-1982	Diplomarbeit in der Biochemischen Abteilung des hiesigen Diabetes-Forschungsinstituts (Direktor: Prof.Dr. H. Reinauer) mit dem Thema: "Glycogenstoffwechsel im Herzmuskel diabetischer Ratten"
1983-1986	Anfertigung der vorliegenden Dissertation in der Biochemischen Abteilung des Diabetes-Forschungsinstituts (Direktor: Prof.Dr. H. Reinauer)